Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER - PASADENA, **E. BÜNNING** - TÜBINGEN, **A. ERNST** - ZÜRICH
H. v. GUTTENBERG - ROSTOCK, **R. HARDER** - GÖTTINGEN
W. SCHUMACHER - BONN

HERAUSGEGEBEN VON

WILHELM RUHLAND UND **OTTO RENNER**

47. BAND, 5. HEFT

MIT 35 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 21. AUGUST 1956)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956

Planta (Berl.)

Preis DM 19.60

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Herausgegeben von *W. Ruhland, H. Winkler*. Berlin, Springer. Bis Band 21 als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E: Planta".

Die Zeitschrift „**Planta**", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Otto Renner*, (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzinger Straße 67*.

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 24 92 51
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 2 79 01

---

47. Band **Inhaltsverzeichnis** 5. Heft

Seite

Ziegler, H., Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. Mit 16 Textabbildungen 447

Kowalewicz, R., Zur Kenntnis von Epilobium und Oenothera. 1. Über die Rhaphidenschläuche. 2. Über intergenerische Transplantation. Mit 5 Textabbildungen 501

Schlegel, H.-G., Die Verwertung organischer Säuren durch Chlorella im Licht. Mit 7 Textabbildungen 510

Kiermayer, O., Eine einfache Arbeitsweise für den Koleoptilzylindertest. Mit 1 Textabbildung 527

Röbbelen, G., Über die Protochlorophyllreduktion in einer Mutante von Arabidopsis thaliana (L) Heynh. Mit 6 Textabbildungen 532

Planta, Bd. 47, S. 447—500 (1956)

Aus dem Forstbotanischen Institut München

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LEITUNG UND SEKRETION DER ASSIMILATE*

Von

HUBERT ZIEGLER

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. März 1956)

Einleitung

Seitdem in den letzten 25 Jahren nach langer Vernachlässigung die Probleme der Assimilatfernleitung zu einem der Schwerpunkte der pflanzenphysiologischen Forschung geworden sind, steht die Frage nach dem Mechanismus des Transportes eindeutig im Vordergrund des Interesses, derart, daß die Frage nach der Art des beförderten Materials nur am Rande behandelt wurde. Dabei ist die Kenntnis der Stoffe, von denen die gesamten Umsetzungen der nicht selbst zur Photosynthese befähigten Gewebe der Pflanze ausgehen müssen, von grundlegender Wichtigkeit für eine Analyse der Stoffwechselleistungen dieser Pflanzenteile.

Eine eingehendere Untersuchung der Zusammensetzung des Siebröhreninhaltes scheint daher dringend erforderlich, zumal eine genauere Kenntnis der stofflichen und fermentativen Ausstattung der Leitgewebe auch der Klärung des Transportmechanismus dienlich sein dürfte.

Für die Leitung der Kohlenhydrate haben Analysen dieser Art bereits wichtige Ergebnisse erzielt: WANNER (1953a, b) konnte u. a. zeigen, daß bei den von ihm untersuchten Bäumen der Rohrzucker die praktisch einzige Transportform der Kohlenhydrate darstellt (worauf auch schon ältere Untersuchungen hinwiesen, s. u.), daß dieses Disaccharid wahrscheinlich aus Zuckerphosphaten nach deren Dephosphorylierung in den fermentativ entsprechend ausgestatteten Geleitzellen der Siebröhren gebildet wird und daß es in den Siebröhren selbst infolge des Fehlens der abbauenden Fermente unangetastet bleibt.

Eine Fülle von Fragen blieb aber auch jetzt noch für den Kohlenhydrattransport ungeklärt, beziehungsweise ergab sich erst aus diesen Befunden, so z. B.: Ist der Rohrzucker allgemein die bevorzugte Wanderform der Kohlenhydrate in den Siebröhren; wenn ja, warum hat er sich allgemein durchgesetzt? Aus welchen Bestandteilen und an welchen Orten wird die Saccharose synthetisiert und wie gelangt sie in die

* Habilitationsschrift der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München.

Leitbahnen? Welchen Veränderungen unterliegt der Zucker bei der Entnahme aus den Siebröhren? Läßt sich eine Beteiligung der Phosphorsäure auch bei der Bildung bzw. Sekretion anderer zuckerhaltiger Pflanzensäfte (Blutungssaft, Nektar u. ä.) nachweisen?

Noch lückenhafter ist unsere Kenntnis von den organischen Stickstoffverbindungen in den Siebröhren. Ungeklärt ist z. B., ob die Zusammensetzung der Aminosäuren im Siebröhrensaft derjenigen des Blattparenchyms entspricht, ihre Konzentration beim Übertritt in die Leitbahnen unverändert bleibt, ihre Menge in den Siebröhren im Laufe eines Tages und in den verschiedenen Höhen der Leitbahnen schwankt u. a. m.

Ziel unserer Untersuchungen ist es, durch eine möglichst eingehende chemische Analyse der Siebröhrensäfte, durch einen Vergleich der Art und Menge der transportierten Stoffe mit den entsprechenden Bestandteilen der Gewebe bzw. Säfte, aus denen sie in die Leitbahnen gelangen oder in die sie aus den Siebröhren übergehen, und durch eine Bearbeitung der Physiologie der Übergangs- und Sekretionsgewebe (Geleitzellen, Nektarien u. ä.) zu einem besseren Verständnis der mit dem Assimilatferntransport verknüpften Umsetzungen zu gelangen.

Über die ersten Ergebnisse, die während zweier Vegetationsperioden (1954 und 1955) gewonnen wurden, soll in der folgenden Arbeit berichtet werden.

Herrn Prof. Dr. BRUNO HUBER sei auch an dieser Stelle für die bereitwillige Unterstützung der Arbeit mit den Mitteln seines Institutes und für das Interesse, mit dem er ihren Fortgang verfolgt hat, verbindlichst gedankt. Den Herren Prof. Dr. O. RENNER und Prof. Dr. F. LYNEN ist der Verf. für klärende Diskussionen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft für apparative und finanzielle Beihilfe zu großem Dank verpflichtet.

A. Material und allgemeine Methode

Zur Gewinnung der Siebröhrensäfte wurden zahlreiche Bäume herangezogen, bei denen ein Anschneiden des Phloëms nach dem Vorgange von HARTIG (1860) zu einem Austreten des Siebröhrensaftes führt. Für eingehendere Untersuchungen kamen dagegen nur Arten mit ergiebigem Saftfluß in Frage; wir analysierten bevorzugt Siebröhrensäfte von *Robinia pseudoacacia* L., *Quercus borealis* MICHX., *Qu. robur* L. (= *Qu. pedunculata* EHRH.) und *Fraxinus americana* L. Die Bäume stehen teils im Institutshof des Forstbotanischen Institutes München, teils im Forstbotanischen Garten Grafrath. Das Anschneiden der „Safthaut" ist bereits mehrfach eingehend beschrieben (vgl. z. B. MÜNCH 1930). Es gibt wohl kaum ernsthafte Zweifel, daß es sich bei dem dabei austretenden Saft tatsächlich um den Inhalt der Siebröhren handelt, wenn auch weitergehende Schlüsse von der Art des Austretens auf den Mechanismus des Transportes in den Leitbahnen vielfach abgelehnt werden (CURTIS 1935, SCHUMACHER 1937 u. a.). Im übrigen werden wir die Herkunft des Zapfsaftes aus den Siebröhren unten eindeutig belegen.

Die gewonnenen Säfte wurden entweder sofort verarbeitet oder nach Zusatz von Thymol bis zur Analyse im Kühlschrank bei 0° C aufbewahrt. Die für die

Wurzelkulturen benötigten größeren Saftmengen (die durchwegs den ausgedehnteren Beständen des Grafrather Forstgartens entstammten) wurden nach dem Einfrieren in einer Eis-Kochsalzmischung in gefrorenem Zustand transportiert, im Kühlschrank (bei $+1^{0}$ C) aufgetaut und dann sterilisiert (s. u.). Infolge der unvermeidlichen Infektion bei der Zapfprozedur geht die Zersetzung der Siebröhrensäfte sehr schnell vor sich und verändert ihre stoffliche Zusammensetzung in kurzer Zeit grundlegend.

Nektar lieferten *Robinia pseudoacacia*, *Hoya carnosa* R. Br. (Asclepiadaceae) und *Abutilon striatum* DICKS (Malvaceae). Er wurde in eine Mikrocapillare eingezogen und in ein gekühltes Röhrchen geblasen, aus dem er dann zu der stets unmittelbar anschließenden Verarbeitung entnommen wurde. Bei der Abnahme des Nektars wurde eine Verletzung der tragenden Blütenorgane sorgfältig vermeiden, weil sie gerade die Analysenwerte der Aminosäuren völlig verfälscht.

Der Honigtau von *Hedera helix* L. wurde auf einer in die Spritzrichtung der Läuse gebrachten Glasplatte aufgefangen und von dieser abgelöst. Ein Abnehmen von der Blattoberfläche verändert ebenfalls die Aminosäurengehalte. Der (spärlich — aber im Gegensatz zum Inhalt der phloëmständigen Sekretkanäle sofort — zutage tretende) Siebröhrensaft des Efeus wurde zum Vergleich herangezogen.

Frühjahrsblutungssaft wurde aus zahlreichen Bäumen [*Alnus glutinosa* (L.) GAERTN., *Acer platanoides* L., *A. pseudoplatanus* L., *A. circinatum* PURSH., *A. campestre* L., *A. saccharum* MARSH., *A. tataricum* L., *Betula pendula* ROTH (= *B. verrucosa* EHRH.), *B. pubescens* EHRH., *Carpinus betulus* L., *Fagus sylvatica* L., *Juglans regia* L. und *Tilia platyphyllos* SCOP. (= *T. grandifolia* EHRH.)] durch Anbohren des Holzkörpers und Einbringen eines passenden gewinkelten Glasstückes in das Bohrloch entnommen; die ausgezogene Spitze des Glasrohres wurde durch einen Stopfen in ein Reagenzglas bezw. in einen Glaskolben geleitet, eine Kapillare in einer zweiten Bohrung des Stopfens ermöglichte den Austritt der verdrängten Luft. Auch der Frühjahrsblutungssaft wurde sofort verarbeitet oder in der angegebenen Weise vor einer Zersetzung geschützt. *Sanchezia nobilis* HOOK. (Acanthaceae) und *Myriocarpa cordifolia* LIEBM. (Urticaceae) lieferten Blutungssäfte, die nicht der Beförderung mobilisierter Reservestoffe während einer begrenzten Zeit dienen. Sie wurden in der bei Vorlesungsversuchen üblichen Weise durch Verbindung einer ableitenden Glasröhre durch einen Gummistutzen mit dem Sproß gewonnen.

Der Inhalt der Gefäße wurde bei *Dioscorea batatas* DCSNE. (Dioscoreaceae) durch Ausblasen einzelner, mittels eines scharfen Messers gekappter Internodien erhalten. Die basale Trennfläche wurde dazu schräg geschnitten, mit Aqua dest. abgespritzt und mit einem Cellulosebausch abgetrocknet; sie fungierte als Ablauf. Bei *Robinia* ist die Adhäsion des Gefäßwassers an den Gefäßmembranen nicht so leicht zu überwinden wie bei der weitlumigen Liane; hier wurde der Inhalt der Gefäße mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt (Einzelheiten s. u.).

Blattpreßsäfte schließlich wurden von *Robinia pseudoacacia*, *Quercus borealis*, *Qu. robur*, *Acer platanoides*, *Fraxinus americana* und *Hoya carnosa* in der Weise hergestellt, daß die frischgesammelten Blätter mit Aqua dest. abgespritzt, mit einem Wattebausch schnell getrocknet, von den Hauptrippen befreit, mit flüssigem Stickstoff übergossen und nach dem Auftauen (in der geschlossenen Preßkammer einer Öldruckpresse) bei 200 atü ausgepreßt wurden.

Die qualitative Bestimmung der Zucker und Aminosäuren erfolgte papierchromatographisch nach der auf- und absteigenden eindimensionalen Methode mit Whatman No. 1- und Schleicher-Schüll 2043b-Papieren. Aufgetragen wurde nach den Angaben von SCHWERDTFEGER (1954) auf Papierbrücken, die durch

Fünfecke voneinander getrennt waren. Als Laufmittel diente Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50) und wassergesättigtes Phenol. Entwickelt wurden die reduzierenden Zucker mit Anilinphthalat (0,93 g Anilin und 1,66 g Phthalsäure in 100 ml wassergesättigtem Butanol; Farbentwicklung 5 min bei 105° C), die Saccharose mit Naphthoresorcin/Trichloressigsäure (0,2% Naphthoresorcin in Äthanol — g:v — mit 2%iger wäßr. Trichloressigsäure — g:v — vor Gebrauch gemischt; Farbentwicklung 5 min bei 105° C); im übrigen reagiert Saccharose unter den beschriebenen Bedingungen auch schwach mit Anilinphthalat (wahrscheinlich infolge geringfügiger Hydrolyse bei der Entwicklung), so daß bei starkem Überwiegen des Rohrzuckers über die Hexosen (z. B. im Siebröhrensaft) seine Anwesenheit neben den Monosen mit demselben Reagens festgestellt werden kann.

Die Aminosäuren wurden mit butylalkoholischem Ninhydrin in der üblichen Weise entwickelt. Zur Verstärkung der Farbtiefe wurde das Chromatogramm nach dem Besprühen 1 min in eine Wasserdampfatmosphäre von 100° C gebracht und dann 5 min bei 105° C entwickelt (BRÜGGEMANN und DREPPER 1952).

Die quantitative Bestimmung der reduzierenden Zucker wurde nach der WALLENFELSschen Methode der Tetrazolium-Reduktion (nach PAECH u. TRACEY 1955) durchgeführt. Photometriert wurde im Eppendorf-Photometer bei 405 mμ; die Absolutwerte wurden mit einer Eichkurve ermittelt.

Die nichtreduzierenden Zucker ließen sich durch die Differenz der Reduktionswerte derselben Ausgangsmenge nach vollständiger Hydrolyse in 3%iger Schwefelsäure bei 100° C (Wasserbad) und in unhydrolysiertem Zustand bestimmen. Der Anteil der Saccharose an der Gesamtmenge der nichtreduzierenden Zucker wurde durch papierchromatographische Isolierung, Elution der durch einen entwickelten Vergleichsflecken gekennzeichneten, ausgeschnittenen Saccharosezone mit Wasser, nachfolgende Hydrolyse und kolorimetrische Bestimmung in der angegebenen Weise festgelegt. Die hydrolysierten Proben müssen dabei vor der Durchführung der Tetrazolium-Reaktion mit einer entsprechenden Menge Lauge (n/1 NaOH) neutralisiert und nach Entwicklung des roten Formazans und seiner Aufnahme in den Isopropylalkohol von dem ausfallenden Natriumsulfat auf der Zentrifuge getrennt werden.

Eine quantitative Bestimmung einzelner Aminosäuren wurde in den bisherigen Versuchen nicht durchgeführt; sie ist vielfach infolge der äußerst geringen Mengen (Nektar, Honigtau) auch kaum möglich. Bestimmt wurde aber die Gesamtmenge der Ninhydrin-positiven Substanzen mittels einer äußerst empfindlichen Reaktion, die noch etwa 5 γ/ml Aminosäuren neben einem erdrückenden Überschuß anderen organischen Materials nachzuweisen gestattet. Es wurde dazu die zu analysierende Lösung mit einem Gehalt von 5—50 γ Aminosäuren (vom Siebröhren- und Blattpreßsaft meist 0,01 ml, vom Nektar, Honigtau u. ä. bis 1 ml) in 0,3 ml von (0,3%iger Trilonlösung in m/15 Citratpuffer vom p_H 5,0) und 3 ml aldehyd- und peroxydfreiem Butanol, in dem 3 mg Ninhydrin gelöst waren, 15 min am Rückflußkühler gekocht, abgekühlt und mit 50%igem Methanol auf 10 ml aufgefüllt. Die entstandene Färbung — die etwa 10 Stunden haltbar ist — wurde bei 578 mμ im „Eppendorf" photometriert. Da die einzelnen Aminosäuren verschieden starke Ninhydrinfärbungen geben, sind die Extinktionswerte für unterschiedlich zusammengesetzte Gemische nicht streng vergleichbar und nicht exakt auf Absolutmengen umzurechnen. Immerhin gestattet die angegebene Methode, Größenordnungen für die Gehalte an Ninhydrin-positiven Substanzen (Aminosäuren, Oligopeptide, Amide u. ä.) festzulegen. Zu diesem Zwecke wurde einerseits eine Ninhydrin-Standardkurve für Leucin als Vergleich herangezogen und andererseits durch die Einordnung der Absorptionswerte der aminosäurenarmen Proben in Kurven der Absorptionswerte der reicheren Säfte bei verschieden starker

Verdünnung der Gehalt der einzelnen Lösungen zueinander in Beziehung gesetzt. Zur quantitativen Analyse des Trichloressigsäure (TES)-löslichen und TES-unlöslichen Stickstoffes diente die Mikro-Kjeldahl-Methode. Vorgelegt wurde n/50 HCl, rücktitriert mit n/50 NaOH mit Methylrot + Bromkresolgrün als Indikator. Die quantitative Bestimmung der Phosphatkonzentrationen erfolgte im TES-Auszug in der üblichen Weise: Das anorganische Phosphat wurde nach MARTLAND u. ROBISON (1926) durch die photometrische Bestimmung (bei 720 mμ) der entwickelten Molybdänblaufärbung und Vergleich der erhaltenen Extinktionswerte mit einer Phosphat-Eichkurve bestimmt. Die Menge des leicht hydrolysierbaren Phosphats ergab sich durch die Vermehrung des anorganischen Phosphats nach einer 7minütigen Hydrolyse der Analysenlösung in 1/n HCl bei 100° C (Wasserbad), die Menge des Gesamtphosphats durch die Bestimmung des anorganischen Phosphats nach vollständiger Veraschung einer aliquoten Menge in 30%iger Schwefelsäure.

Die p_H-Werte wurden mittels eines Potentiometers mit Chinhydronelektrode (p_H-Ionoskop der Firma Pusel, München) bestimmt. Spezielle Methoden, die zur Lösung von Einzelproblemen herangezogen wurden, sollen bei den betreffenden Abschnitten beschrieben werden.

B. Ergebnisse

I. Der Siebröhrensaft

1. Die chemische Zusammensetzung

a) Die Kohlenhydrate. Wie bereits einleitend ausgeführt, hat WANNER (1953a) für *Robinia pseudoacacia* und *Carpinus betulus* mit moderner Methodik die älteren Angaben vieler Autoren (s. u.) bestätigt, wonach der Rohrzucker die mengenmäßig weit überwiegende Kohlenhydratverbindung in den Siebröhren darstellt. WANNER fand in seinen ebenfalls durch Anschneiden der Safthaut gewonnenen Proben überhaupt keinen anderen Zucker vor, vor allem ließen sich auch keine Zuckerphosphate nachweisen. Dies war insoferne überraschend, als man heute weiß, daß diese Ester nicht nur bereits bei der Photosynthese entstehen, sondern ganz allgemein als stoffwechselaktive Form der Kohlenhydrate zu betrachten sind, in welche die freien Hexosen vor Einbeziehung in den Stoffwechsel erst durch die Knüpfung der Esterbindung übergeführt werden müssen (s. u.).

Bevor nun aus den WANNERschen Befunden allgemeine Gesetzmäßigkeiten für den Kohlenhydrattransport abgeleitet werden konnten, war zu prüfen, ob diese Ergebnisse nicht nur begrenzte Gültigkeit haben, d. h. ob der Rohrzucker ganz allgemein die bevorzugte Wanderform der Kohlenhydrate in den Siebröhren darstellt und sowohl freie Hexosen als auch Zuckerphosphate stets vollständig fehlen.

Die zahlreichen Angaben, die durch eine Untersuchung der gesamten Leitgewebe auf ihre Inhaltsstoffe erhalten wurden, und zwar stets ein Überwiegen der Saccharose, aber fast immer auch freie Hexosen ergeben hatten (KURSANOV u. TURKINA 1954: Zuckerrübe; HUMPHRIES 1947: Kakao; ENGARD 1939: Himbeere; MASON u. PHILLIS, 1934: Baum-

wolle; u. a.), können hier keine präzise Antwort geben, da bei diesem Verfahren naturgemäß der Inhalt aller Phloëmelemente, nicht nur der Siebröhren, erfaßt wird.

Die papierchromatographische Analyse der gezapften Siebröhrensäfte aller geprüften Bäume (*Alnus glutinosa*, *A. incana*, *Acer platanoides*, *Castanea sativa* MILL. (= *C. vesca* GAERTN.), *Populus nigra* L., *Quercus borealis*, *Qu. robur*, *Qu. petraea* (MATTUSCHKA) LIEBL. (= *Qu. sessiliflora* SALISB.), *Fagus sylvatica*, *Tilia platyphyllos*, *Robinia pseudoacacia*) ergab durchwegs das Fehlen von freien Hexosen und das Vorhandensein der Saccharose als einziges freies Kohlenhydrat. Leider ist es uns nicht gelungen, aus Vertretern der Gymnospermen durch die Zapfung Siebröhrensaft zu gewinnen, auch nicht aus Eiben, die gelegentlich einen Saftaustritt zeigen sollen (HUBER 1942); wir können daher vorläufig nicht entscheiden, ob sich der Rohrzucker bereits auf dieser Organisationsstufe als Transportzucker durchgesetzt hat.

Auf Dextrine und ähnliche höhere Saccharide, die nach MICHEL (1942) im Eichen *(Quercus robur?)*-Siebröhrensaft in beträchtlichen Mengen (37,5% des Trockengewichtes gegen 44,7% Rohrzucker) vorkommen sollen, nach WANNER (l. c.) dem Robiniensaft fehlen, wurde in der Weise geprüft, daß die Gesamtmenge der reduzierenden Zucker nach vollständiger Hydrolyse einer Probe des Siebröhrensaftes mit der Menge der bei der Hydrolyse des chromatographisch isolierten Rohrzuckers entstehenden Monosen verglichen wurde. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, stimmen bei den geprüften Arten die Werte praktisch überein.

Es kann daher mit Sicherheit gesagt werden, daß auch bei den Eichen Saccharose als einziger Zucker im Siebröhrensaft enthalten ist.

Bei Zapfungen in verschiedenen Stammhöhen läßt sich im allgemeinen ein Konzentrationsgradient im Saccharosegehalt von oben nach unten feststellen, wie dies von HUBER, SCHMIDT u. JAHNEL (1937) für die Roteiche gefunden wurde.

b) Die Stickstoffverbindungen. Unsere Kenntnis von der Art und Menge der organischen Stickstoffverbindungen im Siebröhrensaft ist weit lückenhafter als die der Kohlenhydrate. HARTIG (1860) stellte fest, daß sich beim Aufkochen des Roteichen-Siebröhrensaftes wenig Eiweiß abscheidet; MOOSE (1938) erhielt bei Robinien einen Gesamtstickstoffgehalt von etwa 0,1%. Eine quantitative Eiweißbestimmung im Zapfsaft des Kürbis (COOIL 1941) ergab den hohen Proteingehalt von etwa $^1/_3$ des Trockengewichtes (etwa die 3fache Menge des Zuckergehaltes); wir haben hier zweifellos einen Sonderfall vor uns, in dem die Zusammensetzung des durch die Zapfung gewinnbaren Saftes weder für die Bestimmung der in den eigentlichen Assimilatleitbahnen des Kürbis selbst tatsächlich wandernden Substanzen, noch weniger für die Beurteilung der in den Siebröhren anderer Pflanzen transportierten

Tabelle 1

	Quercus borealis 17. 10. 55	Quercus robur 12. 9. 55	Tilia platyph. 14. 9. 55
Monosenkonzentration nach Hydrolyse des Gesamtsaftes	186 mg/ml	175 mg/ml	188 mg/ml
Monosenkonzentration nach Hydrolyse der abgetrennten Saccharose	179 mg/ml	177 mg/ml	183 mg/ml

(Jeweils Mittel aus 5 Proben).

Stoffe, herangezogen werden kann. Wir bestimmten zunächst den Anteil des TES-unlöslichen (Protein-) und des TES-löslichen Stickstoffes im Siebröhrensaft.

Der Gehalt an Proteinstickstoff lag bei den untersuchten Eichen *(Qu. borealis, Qu. robur, Qu. petraea)* in derselben Größenordnung, und zwar zwischen 0,5 und 1,2 mg/ml. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen, vor allem solchen verschiedenen Alters, machen die Angabe eines Mittelwertes illusorisch, doch lagen die häufigsten Werte um 1,0 mg/ml. Bei *Robinia*, wo uns sehr einheitliches (3jähriges) Material zur Verfügung stand, waren die Schwankungen viel geringer; der Proteinstickstoffgehalt des Siebröhrensaftes betrug 1,95 bis 2,10 mg/ml. Wichtig scheint der Befund, daß sich innerhalb eines Individuums die Proteinmenge des in verschiedenen Höhen gezapften Siebröhrensaftes *nicht* veränderte (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Siebröhrensaft von Quercus borealis* (30. 9. 54; GRAFRATH)

	Proteinstickstoff	
	2 m über dem Boden	0,2 m über dem Boden
Baum 1	1,12 mg/ml	1,10 mg/ml
Baum 2	0,85 mg/ml	0,90 mg/ml
Baum 3	0,86 mg/ml	0,85 mg/ml

Dies weist daraufhin, daß es sich bei dem erfaßten Eiweiß sehr wahrscheinlich nicht um in den Siebröhren wandernde Verbindungen, sondern um das Siebröhrenplasma selbst handelt, das bei Anschneiden des Phloëms mit austritt.

Die Werte für den TES-löslichen Stickstoff sind während des Sommers für die drei untersuchten Eichenarten wieder sehr ähnlich und liegen zwischen 0,39 und 0,50 mg/ml (bei Zapfung in Stirnhöhe). Die Streuung ist hier also wesentlich geringer als bei den Werten des Proteinstickstoffes.

Bei den geprüften Robinien beliefen sich die Mengen des TES-löslichen Stickstoffes im Sommer auf 0,65—0,85 mg/ml (bei Zapfung 3jähriger Stämmchen in 1,50 m Höhe).

Im allgemeinen nahmen die Konzentrationen des TES-löslichen Stickstoffes in den Stämmen von Kronenansatz bis zum Wurzelhals ab, und zwar am häufigsten um etwa 0,02 mg/ml je Meter, doch wurden

auch verschiedentlich gleiche Werte in den verschiedenen Zapfhöhen, gelegentlich sogar eine Umkehr des normalen Gefälles festgestellt. Diese Zunahme der Konzentration von oben nach unten war dann zuweilen, durchaus aber nicht immer, von einem Anstieg der Zuckermengen in derselben Richtung begleitet.

Im Herbst, vor Beginn und während der Laubfärbung, zur Zeit der Eiweißmobilisierung in den Blättern, nimmt die Menge des TES-löslichen Stickstoffes sehr stark zu; bei Eichen auf 1,7—4,2 mg/ml, also auf das 2fache bis auf mehr als das 10fache, während sich der Proteinstickstoff bezeichnenderweise in etwa derselben Höhe wie im Sommer hält.

GRASSMANN u. Mitarbeiter (unveröffentlicht; zit. nach HUBER 1944) hatten bei der Analyse von Roteichensiebröhrensaft einen herbstlichen Anstieg des Gesamtstickstoffgehaltes auf das 10fache gefunden; dieser Wert liegt nach unseren zahlreichen Messungen (25 Bäume) auch für die Roteiche wesentlich über dem Durchschnitt.

Die Konzentration der TES-löslichen Stickstoffverbindungen des „Herbstsaftes" nahm stets, aber verschieden stark, im Stamm nach unten ab, vielfach um etwa 0,05 mg/ml je Meter.

Die Mengenverhältnisse der mit der Ninhydrinreaktion färbbaren Verbindungen (Aminosäuren, Oligopeptide, Amine u. ä.) änderten sich in ganz ähnlicher Weise wie die des gesamten TES-löslichen Stickstoffes. So war bei *Robinia* während der herbstlichen Eiweißmobilisierung (Beginn 1955 während der ersten Oktoberwoche) eine Zunahme der Konzentration dieser Stoffe auf beinahe den 10fachen Wert festzustellen (Absorption von 0,01 ml Siebröhrensaft vor der Vergilbung, 13. 9. 55: 81,2%; Absorption von 0,001 ml während der Vergilbung, 17. 10. 55: 78,3%). Auch der Konzentrationsgradient von oben nach unten trat bei der Ninhydrin-Reaktion im Sommer meist, im Herbst stets in Erscheinung.

Beim papierchromatographischen Nachweis der einzelnen Aminosäuren in verschiedenen Siebröhrensäften zeigte sich, daß in den meisten Fällen die herbstliche Rückführung der mobilisierten Blatteiweiße den Siebröhrensaft auch qualitativ sehr stark verändert: Während sich bei *Qu. borealis*, *Qu. robur* und *Qu. petraea* sowie bei *Acer platanoides* übereinstimmend während des Sommers nur Glutaminsäure und Asparaginsäure in größerer, Alanin in geringerer Menge im Siebröhrensaft finden, treten im Herbst zusätzlich zahlreiche andere Aminosäuren in größerer Menge im Siebröhrensaft auf; bei den Eichen z. B. Asparagin, Glutamin, Serin, Methionin, Valin und Leucin.

Bei der Robinie finden sich zwar im Sommer- und Herbstsaft dieselben Aminosäuren, doch sind die Anteile der einzelnen Verbindungen zum Teil stark verschoben (Tabelle 3).

Tabelle 3. *Anteil der einzelnen Aminosäuren im Siebröhrensaft von Robinia pseudoacacia*

Sommersaft		Herbstsaft	
Glutaminsäure	++++	Prolin	+++++
Leucin	++++	Leucin	++++
Valin	++++	Valin	++++
Alanin	+++	Alanin	+++
Asparaginsäure	+++	Glutaminsäure	+++
Prolin	+	Asparaginsäure	+++
Serin	+	Serin	++
Lysin	+	Glutamin	++
Methionin	+	Lysin	+
Asparagin	+	Asparagin	+
Glutamin	+	Methionin	+

(Die gleiche Anzahl von Kreuzen bezeichnet größenordnungsmäßig — nach der Fleckenvergleichsmethode — übereinstimmende Konzentrationen).

Besonders auffallend ist die sehr starke Zunahme der Prolinkonzentration im Herbstsaft, die wir allerdings nur bei der Robinie gefunden haben.

c) Die Phosphatfraktionen. In Anbetracht der Bedeutung, die wir heute der Phosphorsäure auch für den Transport der Kohlenhydrate zuschreiben, schien eine quantitative Erfassung des anorganischen Phosphats und der organischen Phosphorverbindungen im Siebröhrensaft besonders wichtig. Führt man sich vor Augen, daß die bei der Assimilation oder der Mobilisierung von Reservestoffen entstehenden Kohlenhydrate — sofern es sich nicht um Saccharose handelt — vor Eintritt in die Siebröhren in Rohrzucker übergeführt werden müssen, diese Synthese aber nach unseren heutigen Kenntnissen zunächst wohl meist zum Saccharosephosphat führt, das durch die in den Geleitzellen der Siebröhren und in den Siebröhren selbst nachgewiesene Phosphatase (Yin 1945, Wanner 1952, Bauer 1953, Frey 1954) desphosphoryliert werden kann (s. u.), so könnte man daran denken, daß zwischen der Konzentration der Saccharose und der Konzentration des anorganischen Phosphats in Siebröhrensaft engere Zusammenhänge bestünden, daß unter Umständen (bei quantitativer Entstehung der Siebröhrensaccharose aus Saccharosephosphat und gleichmäßiger Diffusion der bei der Spaltung entstehenden Produkte in die Siebröhren) sogar beide Verbindungen in ihren Molaritäten weitgehend übereinstimmten. Auch an eine dem Saccharoselängsgradienten entsprechende Abnahme des anorganischen Phosphats während des Transportes ließ sich denken, da sich auf diese Weise eine bei der Entnahme des Rohrzuckers aus den Leitbahnen mögliche Rephosphorylierung bemerkbar machen könnte. Im übrigen schien bei einer solchen einfachen Beziehung zwischen Zucker- und Phosphatkonzentration eine ideale Möglichkeit gegeben, das lang-

ersehnte experimentum crucis für oder gegen die Massenströmung durchzuführen: Wanderten die dem mittäglichen Assimilationsmaximum entsprechenden Konzentrationsmaxima von Zucker und anorganischem Phosphat über längere Strekken *miteinander* gegen den Stammgrund, so wäre ein gemeinsamer Transport gesichert. Die quantitative Bestimmung des anorganischen Phosphats im Siebröhrensaft und der Vergleich mit den entsprechenden Zuckerkonzentrationen ergab nun aber keine derartige Beziehung, wie aus den nebenstehenden Tabellen (4—7) hervorgeht.

Tabelle 4. *Siebröhrensaft von Tilia platyphyllos* (21. 8. 54; GRAFRATH, 15^{30} Uhr)

	Saccharose[1]	Anorg. Phosphat
Höhe 0,2 Meter	0,51 mol.	0,0044 mol.
Höhe 1,70 Meter	0,55 mol.	0,0036 mol.

Tabelle 5. *Siebröhrensaft von Acer platanoides* (21. 8. 54; GRAFRATH, 10^{30} Uhr)

	Saccharose[1]	Anorg. Phosphat
Höhe 0,2 Meter	0,52 mol.	0,01 mol.
Höhe 1,7 Meter	0,58 mol.	0,0088 mol.
Höhe 3,5 Meter	0,60 mol.	0,0078 mol.

Tabelle 6. *Siebröhrensaft von Robinia pseudoacacia* (28. 8. 54; GRAFRATH, 10 Uhr)

	Saccharose[1]	Anorg. Phosphat
Höhe 0,2 Meter	0,35 mol.	0,006 mol.
Höhe 1,7 Meter	0,40 mol.	0,0077 mol.
Höhe 3,0 Meter	0,52 mol.	0,0075 mol.

Tabelle 7. *Siebröhrensaft von Quercus borealis* (20. 8. 54; GRAFRATH, 11 Uhr)

	Saccharose[1]	Anorg. Phosphat
Höhe 1,5 Meter	0,55 mol.	0,0035 mol.
Höhe 3,0 Meter	0,52 mol.	0,0027 mol.

(Bemerkung: Der Baum war bereits in früheren Jahren in 1,50 Meter Höhe oft gezapft und daher praktisch geringelt, weshalb sich hier die hohen Zuckerwerte finden.)

[1] Die Bestimmung der Saccharosekonzentration erfolgte mit dem Handrefraktometer nach Zeiss.

In denselben Größenordnungen bewegen sich auch die Konzentrationsverhältnisse bei den übrigen untersuchten Bäumen (*Alnus glutinosa*, *Carpinus betulus*, *Castanea sativa* und *Fagus sylvatica*).

Während demnach die Saccharosekonzentration des Siebröhrensaftes meist etwa einer $^1/_2$ molaren Lösung entspricht, liegt die Konzentration des anorganischen Phosphats zu allermeist unter $^1/_{100}$ molar, in unseren sehr zahlreichen (über 2000) Analysen jedenfalls nie über $^1/_{60}$ molar.

Der Vergleich der Mengen in den verschiedenen Stammhöhen zeigt außerdem, daß das Konzentrationsgefälle beim anorganischen Phosphat meist — nicht immer, siehe z. B. Tabelle 6 — dem des Rohrzuckers entgegengesetzt gerichtet ist, d. h., daß das Phosphat nach unten zunimmt. Daß Zuckerabnahme und Phosphatzunahme aber nicht ursächlich miteinander verknüpft sind, zeigt Tabelle 7: Die Ringelung bewirkt einen Stau *beider* Stoffe.

Auch in den Konzentrationsschwankungen im Siebröhrensaft während des Tages und der Nacht lassen sich zwischen Zucker- und Phosphatmengen keine gesetzmäßigen Beziehungen feststellen, wie weiter unten eingehender dargelegt wird. Deutlich war dagegen eine Zunahme des anorganischen Phosphats im Siebröhrensaft während des Herbstes zur Zeit der Rückführung des Blattphosphors (s. u.) festzustellen; in dieser Periode wurden die absolut höchsten Phosphatmengen gemessen. Leicht hydrolysierbares Phosphat ließ sich im Siebröhrensaft keines der untersuchten Bäume (s. o.) nachweisen.

Tabelle 8. *Siebröhrensaft von Quercus robur* (14. 10. 54; GRAFRATH, 10^{30}—14 Uhr)

	Anorganisches Phosphat	Schwer hydrolysierbares Phosphat
Höhe 0,2 Meter	357 γ/ml	87 γ/ml
Höhe 1,7 Meter	335 γ/ml	85 γ/ml

(Mittel aus 10 Bäumen).

Tabelle 9. *Siebröhrensaft von Quercus borealis* (14. 10. 54; GRAFRATH, 14^{30}—16 Uhr)

	Anorganisches Phosphat	Schwer hydrolysierbares Phosphat
Höhe 0,2 Meter	540 γ/ml	40 γ/ml
Höhe 1,7 Meter	610 γ/ml	50 γ/ml

(Mittel aus 6 Bäumen).

Tabelle 10. *Siebröhrensaft von Robinia pseudoacacia* (16. 10. 54; GRAFRATH, 9^{30}—10^{30} Uhr)

	Anorganisches Phosphat	Schwer hydrolysierbares Phosphat
Höhe 0,2 Meter	720 γ/ml	87 γ/ml
Höhe 1,7 Meter	720 γ/ml	95 γ/ml

(Mittel aus 5 Bäumen).

Dagegen waren stets recht ansehnliche Mengen von TES-löslichem, schwer hydrolysierbarem Phosphat nachweisbar (Tabellen 8, 9, 10).

Es ist bemerkenswert, daß das schwer hydrolysierbare Phosphat (zu dem neben Phosphatiden u. ä. auch z. B. das Saccharosephosphat zu zählen ist) so wenig wie der Proteinstickstoff Konzentrationsunterschiede in verschiedenen Stammhöhen zeigt; es handelt sich offensichtlich auch hier nicht um Wanderstoffe, sondern um Bestandteile des Siebröhrenplasmas.

d) Der p_H*-Wert.* Es ist stets vermerkt worden, daß die Siebröhrensäfte alkalisch reagieren; diese Reaktion soll z. B. den Rüsseln phloëmsaugender Insekten die Leitbahnen anzeigen und den Saugakt auslösen (FIFE u. FRAMPTON 1936, NUORTEVA 1952). Auch über den p_H-Wert reiner Siebröhrensäfte fehlen aber genauere Angaben. Wir prüften alle von uns zu irgendwelchen Analysen gewonnenen Säfte mittels Universalindicator und fanden immer alkalische Reaktion. Die genaue Messung ergab für 10 Roteichen im Mittel einen Wert von 7,95 (geringster Wert 7,45, höchster 8,4), für 10 Stieleichen ein Mittel von 8,18 (7,8—8,55), für 5 Robinien ein Mittel von 8,43 (7,95—8,66). Es hat den Anschein, als ob die Alkalität in den Stämmen nach unten geringer

würde, doch können darüber nur nach noch ausgedehnteren Analysen eindeutige Aussagen gemacht werden.

Über die für die alkalische Reaktion verantwortlichen Substanzen wissen wir vorerst nichts Sicheres. ARENS (1939) hat hierfür die hydrolytische Spaltung von Zucker-Calciumverbindungen in Siebröhrensaft in Erwägung gezogen. Diese Annahme kann nicht nur auf Grund unserer heutigen Kenntnis des Zuckergehalts der Siebröhren (freie Saccharose als einzige Wanderform) nicht zutreffen, sondern fußt auch auf einer irrigen Voraussetzung: ARENS hatte aus der Tatsache, daß der (auf das Trockengewicht bezogene!) Calciumgehalt der Blätter im Gegensatz zu den Mengen anderer Salze bei Nacht stets höher lag als bei Tag, den Schluß gezogen, daß das Calcium mit den Kohlenhydraten abwanderte. Dagegen hat bereits ROUSCHAL (1940) eingewendet, daß der Abtransport der Zucker auch nachts anhält; da zudem zahlreiche Hinweise darauf vorliegen, daß gerade das Calcium nicht „phloëmmobil" ist (vgl. ARISZ 1952), erklärt sich die Sonderstellung des Calciums in den Blättern ganz einfach daraus, daß es im Gegensatz zu den anderen Salzen *nicht* aus den Blättern abgeführt wird. Seine Menge muß dann ja bei Bezug auf das Trockengewicht nachts relativ zunehmen, da sich zu dieser Zeit die Trockensubstanz infolge des Wegfalls der Assimilation und des Fortgangs der Ableitung verringert. Wir werden auf diese bemerkenswerte Sonderstellung des Calciums noch zu sprechen kommen.

Die Alkalität des Siebröhrensaftes ist zwar, wie erwähnt, altbekannt, bisher aber merkwürdigerweise kaum in ihrer Bedeutung für die Siebröhrenfunktion gewürdigt worden (s. u.). So war z. B. daran zu denken, daß die von WANNER (1953 b) festgestellte Inaktivität zahlreicher Fermente der Glykolyse im Siebröhrensaft durch dessen Alkalität verursacht ist (das p_H der Ansätze WANNERS betrug 7,0 bis 7,3); die Saccharase (aus Hefe) hat aber ein p_H-Optimum von 4,6 bis 5,0 und erreicht bei p_H 8,25 bereits den isoelektrischen Punkt (NELSON u. BLOOMFIELD 1924).

Wir haben zur Prüfung dieser Frage Siebröhrensaft auf verschiedene p_H-Werte gepuffert und untersucht, ob sich im sauren Bereich eine Aktivität der Saccharase einstellt.

Zur Durchführung des Versuches wurde ein mit Alkohol abgeriebener Robinienstamm mit einem sterilen Messer angeschnitten und der austretende Saft in einem sterilen Röhrchen aufgefangen. Von diesem Saft wurden je 0,1 ml zu je 0,5 ml sterilisiertem m/15 Phosphatpuffer unter sterilen Kautelen in mit Wattepfropfen verschlossene Reagensgläser gegeben und diese bei 30° C im Wasserbad geschüttelt. Zu verschiedenen Zeiten wurden mit keimfreier Pipette je 0,1 ml entnommen und mit der Tetrazolium-Reaktion auf reduzierende Zucker untersucht. Geprüft wurde bei p_H 4,6, 5,6, 6,6 und 7,6. Längste Inkubationsdauer: 20 Stunden.

Solange der Siebröhrensaft steril blieb, war in keinem der geprüften p_H-Bereiche eine Saccharase-Aktivität festzustellen. Es ist daher anzunehmen, daß das Enzym — und wahrscheinlich auch die anderen von WANNER mit negativem Erfolg getesteten — dem Siebröhrensaft der Robinie tatsächlich fehlen und nicht nur durch das alkalische Milieu an ihrer Aktivität gehindert sind.

Es ist aber durchaus nicht von der Hand zu weisen, daß die Alkalisierung des Zellinhaltes bei der Reifung der Siebröhren in ursächlichem Zusammenhang mit dem Verlust (Denaturierung!) der Fermente steht.

e) Gerbstoffe und ihre Vorstufen. GRASSMANN (unveröffentlicht, zit. nach HUBER 1942) hatte bei der Analyse des Roteichen-Siebröhrensaftes beachtliche Mengen von Gerbstoffen und Gerbstoffvorstufen gefunden. Der Siebröhrensaft aller gezapften Eichen verdankt seine gelbliche Färbung und seinen adstringierenden Geschmack zweifellos diesen Komponenten. Mit der üblichen Farbreaktion mit Fe III-Salzen (verwendet wurde Eisenalaun in alkoholischer Lösung) lassen sich in allen gezapften Siebröhrensäften mehr oder weniger große Mengen Gerbstoffe (wahrscheinlich Catechine) durch die charakteristische Grünfärbung nachweisen.

Im Siebröhrensaft der Eichen nimmt die Intensität der Färbung bei der Eisenreaktion von der Zapfung an bei der Aufbewahrung stetig ab; gleichzeitig tritt ein braunroter, voluminöser Niederschlag auf, der allen Bearbeitern der Eichensäfte stets aufgefallen ist und zum Teil in Verbindung mit der „Gerinnung" des Siebröhrensaftes nach dem Anschnitt der Leitbahnen gebracht wurde. Ein Zusammenhang zwischen dieser Niederschlagsbildung und dem gleichzeitigen Verschwinden löslicher Gerbstoffe schien von vornherein wahrscheinlich; ein Vergleich der Löslichkeiten und der Absorptionsspektren ließ keine Zweifel mehr daran, daß es sich bei dem Niederschlag der Eichensiebröhrensäfte um kondensierte Gerbstoffe, „Phlobaphene", handelt.

Die Substanz löst sich weder in der Kälte noch in der Hitze in Wasser, Methanol, Äthanol, Butanol, Aceton, Chloroform, Äther, Tetrachlorkohlenstoff, verd. (HCl, HNO_3, H_2SO_4) und konzentrierten Säuren (HCl, HNO_3), verd. Laugen (NH_4OH, NaOH, KOH), auch nicht in kalten konzentrierten Laugen, relativ leicht aber in kochender konzentrierter Natronlauge (32%) mit rotbrauner Farbe.

Das gleiche Lösungsverhalten zeigen die in der Eichenborke enthaltenen roten Phlobaphene: Auch sie lösen sich erst in kochender konzentrierter Lauge. Die Lösungen des im Siebröhrensaft ausfallenden Niederschlags und des Peridermphlobaphens aus Borkenmehl (nach der Entfernung der Fremdstoffe mit Wasser, Aceton, konz. HCl und verd. NaOH, jeweils in der Hitze) in kochender konzentrierter Natronlauge ergaben übereinstimmende Absorptionsspektren (Minimum bei 650 mμ, schwaches Maximum bei 520 mμ, ausgeprägtes Maximum bei 400 mμ).

Da der Gehalt des gezapften Saftes an Gerbstoffen gerade bei den Eichen mit ihren gerbstoffreichen Rinden besonders hoch ist, zudem ihre Menge gegen den Stammgrund und bei älteren Bäumen deutlich zunimmt (dickere Borken!), scheint es uns nicht sicher, ja sogar wenig wahrscheinlich, daß sich diese Stoffe in größerer Konzentration in den intakten Siebröhren finden; sie werden vielmehr erst durch den austretenden Siebröhrensaft beim Durchtritt durch die verletzte Rinde ausgewaschen werden (s. u.).

Es mahnt dieser Befund zur Vorsicht bei der Identifizierung der chemischen Zusammensetzung des gezapften Saftes mit dem tatsächlichen Inhalt der Siebröhren; geringe Mengen verschiedener Stoffe können durchaus aus den durchflossenen Rindenpartien stammen. So

dürften gerade die löslichen Gerbstoffe für die (geringe) Reduktionskapazität des Siebröhrensaftes verantwortlich gemacht werden, die von früheren Untersuchern für reduzierende Zucker beansprucht wurde.

f) Sonstige Stoffe. Für die häufig im gezapften Saft anzutreffenden fluoreszierenden Farbstoffe gilt wohl in der Mehrzahl der Fälle das gleiche: Auch sie werden beim Durchtritt des Saftes aus der Rinde ausgespült. So zeichnet sich gerade der Zapfsaft der Robinie, der Eschen und der Pappel, die in ihren Rinden Flavon-(Syringin; *Robinia*), Cumarin-(Fraxin; *Fraxinus*) und Phenolglykoside *(Populus)* haben, durch besonders intensive Fluorescenz aus; auch hier liefern ältere Bäume und der Stammgrund stets höhere Farbstoffkonzentrationen.

Besonderes Augenmerk wurde noch der Menge des Bors im Siebröhrensaft geschenkt, da verschiedentlich Hinweise auf eine Beteiligung des Bors am Kohlenhydrattransport vorliegen (GAUCH u. DUGGER 1953) und gelegentlich sogar an eine Wanderung von Zucker-Borverbindungen gedacht wurde (KURSANOV 1954). Der negative Ausfall der Curcuma-Papierprobe und des Nachweises von Borsäure-Methylester nach Zusatz von konzentrierter H_2SO_4 und Methylalkohol zum Robiniensiebröhrensaft, Erhitzen des Gemisches und Entzünden des verdampfenden Methanols, ließ erkennen, daß das Element höchstens in Spuren anwesend sein konnte. Der Nachweis mit Alizarin S (SZEBELLÉDY u. TANAY 1936) ergab für die untersuchten Siebröhrensäfte *(Quercus borealis, Qu. robur, Fraxinus americana* und *Robinia pseudoacacia)* Borgehalte von $< 5\ \gamma$/ml. Es kann somit gesagt werden, daß das Bor auch im Siebröhrensaft nur ein „Spurenelement" darstellt und mit Sicherheit keine Zucker-Borverbindungen vorliegen können.

g) Die Viscosität. Die Kenntnis der „Zähigkeit" des Siebröhrensaftes ist einerseits für die Berechnung der Strömungsgeschwindigkeit bei der Annahme einer laminaren Strömung im Innern der Siebröhren im Sinne der Massenströmungstheorie und zum andern für die Ermittlung der von den phloëmausbeutenden Insekten bei der Saugung angewendeten Kräfte vonnöten.

Wir bestimmten zur Kennzeichnung der Viscosität den relativen Reibungskoeffizienten, d. h. das Verhältnis t/t_0 der Durchflußzeiten derselben Volumina Wasser (t_0) und Siebröhrensaft (t) zunächst für einige in den benötigten größeren Mengen gewinnbaren Siebröhrensäfte im TRAUBEschen Stalagmometer bei 20° C (Tabelle 11).

Schon diese wenigen Werte ließen erkennen, daß der Saccharosegehalt des Siebröhrensaftes praktisch ausschließlich die Viscosität bestimmt und die übrigen Inhaltsstoffe infolge ihrer geringen Menge nicht ins Gewicht fallen.

Um diesen Zusammenhang an umfangreichem Material bestätigen zu können, wurde die Methode dahingehend vereinfacht, daß statt

Tabelle 11

	Quercus borealis	Robinia pseudo-acacia	Populus nigra
Rel. Reibungskoeffizient des Siebröhrensaftes .	1,62	1,52	1,38
Saccharosegehalt	22,4%	18,8%	15,4%
Rel. Reibungskoeffizient einer eingestellten Saccharoselösung derselben Konzentration . . .	1,64	1,50	1,42

eines Stalagmometers eine Mikropipette von 0,1 ml Inhalt Verwendung fand; es wurden dabei in einem temperaturkonstanten Raum die Zeiten verglichen, in denen 0,07 ml Wasser bzw. dieselbe Menge des jeweiligen Siebröhrensaftes vom Nullpunkt bis zur 0,07 ml-Marke ausgelaufen waren. Es konnten auf diese Weise auch Siebröhrensäfte geprüft werden, die nur in sehr geringen Mengen zu gewinnen sind. Ein Vergleich der mit dieser Methode erhaltenen t/t_0-Werte mit den im Stalagmometer für denselben Saft *(Quercus borealis)* festgestellten ergab recht ähnliche Größen: 2,421 (im Stalagmometer) zu 2,400 (in der Pipette).

Eine ausgezeichnete Übereinstimmung zeigte sich auch hier zwischen den relativen Reibungskoeffizienten der Säfte und der Saccharoselösungen derselben Konzentration.

Es ergeben sich damit bequeme Bestimmungsmethoden für beide Größen in den Siebröhrensäften:

Der relative Reibungskoeffizient kann durch die einfache refraktometrische Bestimmung der Rohrzucker-Konzentration aus einer Eichkurve der Viscositätswerte verschiedener Saccharose-Konzentrationen erhalten werden, während sich andererseits (etwa bei Fehlen eines Refraktometers) mittels einer Mikropipette und einer Stoppuhr (bei Temperaturkonstanz) der Rohrzuckergehalt auf etwa 1% genau angeben läßt.

Aus der einfachen Beziehung zwischen Rohrzuckergehalt und Viscosität läßt sich ohne weiteres ableiten, daß die Dichte im allgemeinen in den Stämmen nach unten abnimmt und daß sie — wie der Zuckergehalt (s. u.) — einen Tagesgang besitzen muß.

h) Der Siebröhrensaft als Nährboden. Da in den Siebröhren reichlich Kohlenhydrat, organische Stickstoffverbindungen, Wirkstoffe und Salze enthalten sind, schien es denkbar und wahrscheinlich, daß sich isolierte Wurzeln auf Siebröhrensaft-Nährböden derselben Pflanze entwickeln würden.

Zur Prüfung dieser Frage wurden sterilisierte (15 min in konz. Chlorkalklösung) Robiniensamen auf 1,5%igem Agar in Petrischalen zur Keimung gebracht, die Wurzelspitzen (etwa 3 mm) unter sterilen Kautelen abgetrennt und in Reagenzgläser mit Siebröhrensaft-Agar gebracht; dieser wurde in der Weise bereitet, daß Siebröhrensaft nach der Sterilisierung durch Passage eines Bakterienfilters zu

sterilisiertem, noch flüssigem Agar (etwa 60° C) keimfrei in verschiedenen Mengen zupipettiert wurde, so daß der ursprüngliche Saft (mit 20% Saccharosegehalt) auf das 4-, 7-, 10- und 20fache (auf 5%, 2,5%, 2% und 1% Saccharosegehalt) verdünnt wurde.

Überraschenderweise zeigten die Wurzeln in keinem Falle einen wesentlichen Zuwachs, obwohl sie meist wochenlang am Leben blieben. Wahrscheinlich erklärt sich diese Unbrauchbarkeit des Siebröhrensaftes als Wurzelnährlösung einfach daraus, daß der Zuckergehalt so sehr die Menge der anderen Substanzen überwiegt, daß eine Verdünnung auf osmotisch erträgliche Konzentrationen des Zuckers zwangsläufig zu einer Verringerung anderer Nähr- oder Wirkstoffe unter die für das Wachstum erforderliche Mindestkonzentration führt. Der Siebröhrensaft ist nicht eigentlich „Bildungssaft", sondern vielmehr „Transportsaft".

Für Pilze und vor allem Bakterien (alkalische Reaktion!) ist der Siebröhrensaft dagegen eine sehr geeignete Nahrungsquelle; unter ihrem Einfluß zersetzt er sich in kurzer Zeit (s. o.).

2. Der Tagesgang der Stoffkonzentrationen im Siebröhrensaft

Bereits MASON u. MASKELL (1928) setzten Tagesschwankungen im Zuckergehalt der Leitgewebe in Beziehung zu den durch die Assimilation bewirkten Konzentrationsänderungen der Kohlenhydrate in den Blättern. HUBER, SCHMIDT u. JAHNEL stellten durch refraktometrische Messung der Saccharosekonzentration im Siebröhrensaft der Roteiche fest, daß ein dem mittäglichen Assimilationsmaximum entsprechendes Konzentrationsmaximum in den Stämmen mit einer Geschwindigkeit von 1,5 bis 4,6 Meter/Stunde nach unten wandert, wodurch die höchste Zuckerkonzentration an den verschiedenen Zapfhöhen zu ganz verschiedenen Zeiten gemessen wird. LEONHARDT (1940) bestätigte diese Befunde in origineller Weise; er zeigte, daß die Honigtauabgabe von Tannenläusen in ihrer Ergiebigkeit einen ganz entsprechenden Tagesgang erkennen läßt (Minimum am Vormittag, Wiederanstieg bei Eintreffen der neuen Assimilatwelle ab Mittag). Der unmittelbare Zusammenhang der registrierten Schwankungen mit dem Gang der Assimilation wurde dadurch sichergestellt, daß durch eine oberwärtige Verdunkelung der von den Läusen besetzten Triebe der nachmittägliche Anstieg der Honigtauabgabe verhindert werden konnte.

Für den Vitamin B_1-Gehalt des Siebröhrensaftes von *Cucurbita* stellte BUCHBERGER (1952) einen ähnlichen Tagesgang fest; auch die Aneurinmenge ist morgens niedrig und steigt zum Abend an.

Wir fanden bei *Robinia pseudoacacia*, *Qu. borealis* und *Fraxinus americana* einen Tagesgang der Zuckerkonzentration, der mit dem von HUBER, SCHMIDT u. JAHNEL für die Roteiche angegebenen weitgehend übereinstimmte. Bei *Fraxinus americana*, die infolge ihres besonders ergiebigen Saftflusses hierfür besonders geeignet war, wurden nun zu diesem Tagesgang der Zuckerkonzentration die Konzentrationsänderungen des anorganischen Phosphats und der Ninhydrin-positiven Substanzen in Beziehung gesetzt. Da sich uns zudem die Möglichkeit bot, mit Hilfe des URAS den CO_2-Umsatz selbst mitzuregistrieren, konnten wir alle Werte auf ihren Zusammenhang mit dem *gemessenen* Gang der Assimilation prüfen.

Bei den URAS-Messungen wurde durch eine 60 Meter lange Schlauchleitung aus dem Kronenrand des Versuchsbaumes (etwa 30jährige *Fraxinus americana* im Hof der Forstlichen Forschungsanstalt) angesaugt (0,8 l/min). Die Blatteile (je 3 Fiederblättchen) befanden sich in einer Küvette bzw. auf der in unserem Institut kürzlich entwickelten „Ansaugplatte" (Koch 1955; zur Methodik der URAS-Messung vgl. Huber 1950). An beiden Versuchstagen (23. 9. 55 und 24. 9. 55) war das Wetter sonnig und warm.

Aus dem Gang der Konzentrationsschwankungen im Siebröhrensaft in Höhe des Kronenansatzes (5 Meter über dem Boden) läßt sich folgendes entnehmen (Abb. 1):

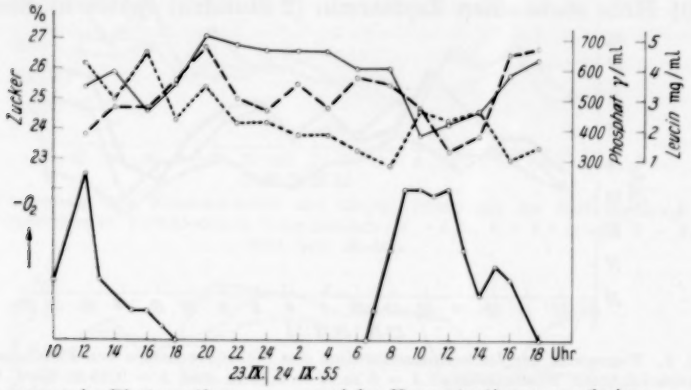

Abb. 1. Tagesgang der Photosynthese ——— und der Konzentrationen von Zucker ———, anorg. Phosphat - - - - - - - und Ninhydrin-positiven Substanzen ——— des Siebröhrensaftes (5 m über dem Boden) bei Fraxinus americana

1. Die Assimilation setzte in diesen Herbsttagen gegen 6^{30} Uhr ein, erreichte mittags (23. 9.) bzw. schon vormittags (24. 9.) das Maximum und um 18 Uhr den Kompensationspunkt.

2. Der Zuckergehalt schwankte auch bei unserem Versuchsobjekt in der bekannten Weise: Die geringsten Werte wurden am Vormittag erhalten, während nachmittags die Konzentration stark anstieg, um in dieser Stammhöhe gegen 20 Uhr zu kulminieren; die Assimilatwelle passierte diese Höhe demnach nach etwa 8 Stunden.

3. Die Schwankungen des anorganischen Phosphats lassen sich nicht in Beziehung bringen zu den Änderungen der Zuckerkonzentration.

4. Die Ninhydrin-positiven Substanzen wiederum zeigen einen sehr ähnlichen Konzentrationsabfall während des Vormittags wie die Zucker, doch sind die Nachtwerte sehr gleichmäßig und weisen kein ausgeprägtes Maximum auf.

Dieser Tagesgang wird verständlich, wenn man bedenkt, daß die in den Leitbahnen abwandernden Aminosäuren im Herbst zum größten Teil nicht durch die Assimilation bzw. durch die unmittelbar an sie anschließenden Umsetzungen bereitgestellt werden, sondern durch die Hydrolyse der Blatt-Eiweiße; dieser enzymatische Prozeß ist nun zwar

auch temperatur-, aber nicht lichtabhängig und wird deshalb kein so scharfes Mittags-Maximum aufweisen wie die Assimilation. Der Rückgang der Eiweißmobilisierung während der (sehr kühlen) Nachtstunden macht sich dagegen — mit entsprechender Verspätung — deutlich im Konzentrationsabfall der Ninhydrin-positiven Substanzen in der Höhe der Zapfstelle bemerkbar.

Ein Vergleich der Tagesgänge der einzelnen Stoffkonzentrationen der in verschiedenen Höhen gezapften Siebröhrensäfte zeigt folgendes:

1. Die Zuckermaxima und -minima (Abb. 2) treten in 2,5 Meter (und 0,40) Höhe stets einen Zapftermin (2 Stunden) später in Erscheinung

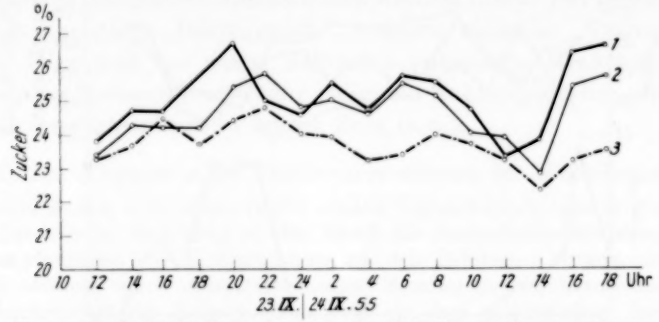

Abb. 2. Tagesgang der Zuckerkonzentration des Siebröhrensaftes von Fraxinus americana in verschiedenen Stammhöhen: *1* = 5 m, *2* = 2,50 m und *3* = 0,40 m über dem Boden

als in 5 Meter Höhe. Zur genaueren Festlegung der Wandergeschwindigkeit dieser Konzentrationswelle wäre eine noch häufigere Zapfung nötig gewesen (mindestens jede Stunde). Leider überstieg das sowohl die Leistungsfähigkeit des Baumes als auch die eines einzelnen Experimentators, zumal die analytische Aufarbeitung der Säfte (bei je 2facher Ausführung von Zucker-, Phosphat- und Ninhydrinreaktion bei jeder Zapfung 18 Analysen) sofort vorgenommen werden muß und daher die 2stündige Zapfpause nicht verkürzt werden kann.

Bei einer solchen kurzfristigeren Zapfung würden sich sehr wahrscheinlich die in unseren Kurven in 0,4 Meter und 2,5 Meter Höhe gleichzeitig registrierten Maxima und Minima auseinanderziehen lassen, sei es durch Vorverlegung der höchsten Werte der höheren, sei es durch Verzögerung des Maximums der tieferen Zapfstelle. Immerhin kann größenordnungsmäßig eine Geschwindigkeit der Wanderung des Konzentrationsmaximums von 1,25 bis 2,50 Meter je Stunde angegeben werden, ein Wert, der mit der von HUBER, SCHMIDT u. JAHNEL für die Roteiche auf demselben Wege gefundenen Geschwindigkeit von 1,5 bis 4,6 Meter je Stunde recht gut übereinstimmt. Die Konzentrationsschwankungen werden — wie bei der Roteiche — gegen den Stammgrund wesentlich schwächer; ebenso nehmen die Absolutwerte entsprechend dem bekannten Konzentrationsgefälle in derselben Richtung im allgemeinen ab.

2. Der Phosphatgehalt (Abb. 3) läßt weder einen gesetzmäßigen Tagesgang noch einheitliche Gradienten innerhalb der verschiedenen Zapfhöhen erkennen.

3. Die Konzentrationsschwankungen der Ninhydrin-positiven Substanzen bewegen sich in recht ähnlicher Weise wie die der Zucker; auch hier prägen sich Anstieg und Abfall in den niederen Höhen stets einen Zapftermin später aus und auch ein Längsgradient ist zumeist erkennbar (Abb. 4).

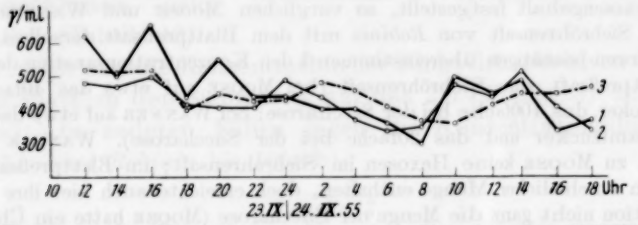

Abb. 3. Tagesgang der Konzentration des anorg. Phosphats im Siebröhrensaft von Fraxinus americana in verschiedenen Stammhöhen: *1* = 5 m, *2* = 2,5 m und *3* = 0,40 m über dem Boden

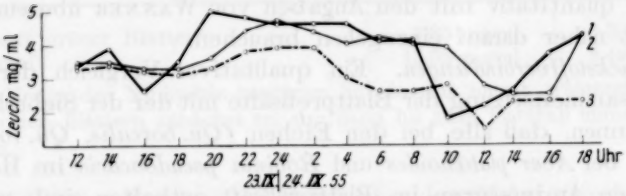

Abb. 4. Tagesgang der Konzentration der Ninhydrin-positiven Substanzen von Fraxinus americana in verschiedenen Stammhöhen: *1* = 5 m, *2* = 2,5 m und *3* = 0,40 m über dem Boden

Die Assimilationsregistrierung an der Esche wurde übrigens bis zum Ende der Vegetationsperiode fortgesetzt und zeigte am 11. 10. 55 zum letzten Male eine (sehr geringe) Assimilation an. Bemerkenswerterweise war schon 2 Tage später (am 13. 10. um 14^{30} Uhr) in der ganzen Stammlänge keinerlei Saftfluß beim Anschneiden des Phloëms mehr festzustellen. Wir werden auf diesen Befund noch zu sprechen kommen.

II. Die stofflichen Beziehungen des Siebröhrensaftes zu anderen Pflanzensäften

1. Die Beziehungen zum Blattpreßsaft

a) Kohlenhydrate. Bereits Mason u. Maskell (1928) [nicht erst, wie meist irrtümlich angegeben (Pfeiffer 1937, Röckl 1949, Bauer 1953), Phillis u. Mason (1933)] stellten bei einem Vergleich der Zuckerkonzentration von Preßsäften aus den Blattlaminae und den Blattmittelrippen, sowie den inneren Rindenpartien (die sie als „sieve tubes" bezeichnen) der Baumwollpflanze fest, daß die Saccharosekonzentration vom Parenchym zu den Mittelrippen auf mehr als das Doppelte und vom Parenchym zu dem Innenteil der Rinde auf das 8fache ansteigt, während die reduzierenden Zucker vom Parenchym zur Mittelrippe um etwa $^1/_3$ zunehmen, vom Parenchym gegen die „sieve tubes" um etwa denselben Betrag zurückgehen.

PHILLIS u. MASON forderten deshalb „some mechanism, either in the petiole or in the vein, or in both, that can accumulate sucrose against a concentration gradient ....." (S. 611).

PFEIFFER fand kryoskopisch ebenfalls häufig ein osmotisches Gefälle vom Siebröhrensaft zum Blattpreßsaft. CURTIS u. ASAI (1939) konnten bei *Fraxinus* und *Cucurbita*, RÖCKL bei *Robinia* diesen Konzentrationshub durch Plasmolyse der Parenchymzellen mit dem Siebröhrensaft derselben Pflanze demonstrieren.

Hatten MASON u. MASKELL und PHILLIS u. MASON (l. c.) in ihren Untersuchungen an der Baumwollstaude noch keinen Siebröhrensaft, sondern Preßsaft der gesamten Innenrinde verwendet (s. o.) und deshalb z. B. stets einen beträchtlichen Hexosengehalt festgestellt, so verglichen MOOSE und WANNER (1953a) gezapften Siebröhrensaft von *Robinia* mit dem Blattpreßsaft derselben Pflanze. Beide Autoren bestätigen übereinstimmend den Konzentrationsanstieg der Zucker vom Blattpreßsaft zum Siebröhrensaft (bei MOOSE auf etwa das 40fache beim Gesamtzucker, das 100fache bei der Saccharose; bei WANNER auf etwa das 10fache beim Gesamtzucker und das 20fache bei der Saccharose). WANNER fand im Gegensatz zu MOOSE keine Hexosen im Siebröhrensaft; im Blattpreßsaft waren sie zwar in ansehnlicher Menge enthalten, doch erreichte auch hier ihre Gesamtkonzentration nicht ganz die Menge der Saccharose (MOOSE hatte ein Überwiegen der Hexosen im Blatt festgestellt).

Unsere Kohlenhydratanalysen an *Robinia* stimmten sowohl qualitativ als auch quantitativ mit den Angaben von WANNER überein, so daß wir nicht näher darauf einzugehen brauchen.

b) Stickstoffverbindungen. Ein qualitativer Vergleich der Aminosäurenzusammensetzung der Blattpreßsäfte mit der der Siebröhrensäfte ließ erkennen, daß alle bei den Eichen *(Qu. borealis, Qu. robur, Qu. petraea)*, bei *Acer platanoides* und *Robinia pseudoacacia* im Herbstsaft gefundenen Aminosäuren im Blattpreßsaft enthalten sind, und zwar auch schon vor der Eiweißmobilisierung. Zu dieser Zeit muß also bei den Eichen und dem Spitzahorn vor dem Eintritt der Aminosäuren ein Umbau in die wandernden Verbindungen (Glutaminsäure, Asparaginsäure, z. T. Alanin, s. o.) erfolgen oder irgendein Filtermechanismus die spezifische Durchlässigkeit bewirken. Aber auch bei den Robinien, wo alle in größerer Menge hervortretenden Blattaminosäuren auch im Sommer im Siebröhrensaft nachweisbar sind, wird der Anteil der einzelnen Komponenten am Gesamtaminosäurengehalt wesentlich verschoben; vor allem ist auch hier das starke Hervortreten der Glutamin- und Asparaginsäure im Siebröhrensaft bemerkenswert, während im Blattpreßsaft vor allem Alanin, Valin und Leucin mengenmäßig überwiegen.

Auch die bei der herbstlichen Eiweißmobilisierung anfallenden Aminosäuren erfahren vor oder bei ihrem Eintritt in die Leitbahnen wesentliche Veränderungen; so ist z. B. Prolin im Blattpreßsaft der Robinie zu dieser Zeit zwar vorhanden, doch keineswegs in einer derart hohen Konzentration wie im Siebröhrensaft, und andererseits ist bei allen untersuchten Bäumen (Eichen, Ahorn und Robinie) der Anteil des Alanins an der Gesamtkonzentration im Blattpreßsaft wesentlich höher als im Siebröhrensaft.

Der Vergleich des Gesamtgehaltes an Ninhydrin-positiven Substanzen[1], von Blattpreßsaft und Siebröhrensaft ergab sowohl für *Robinia* als auch für *Fraxinus americana* in der Sommerszeit eine weitgehende Übereinstimmung (s. Tabelle 12).

Tabelle 12

	Robinia pseudoacacia (22. 8. 54)	Fraxinus americana (22. 8. 54)
Blattpreßsaft .	3,2 mg/ml	3,4 mg/ml
Siebröhrensaft .	3,05 mg/ml	3,52 mg/ml

Im Herbst dagegen verschieben sich die Konzentrationsverhältnisse ganz beträchtlich (Tabelle 13).

Hier steigt also die Konzentration der Ninhydrin-positiven Substanzen vom Blatt zu den Siebröhren auf das 2,5-*(Fraxinus)* und 4fache *(Robinia)*. In anderen Fällen lagen die Konzentrationsdifferenzen noch höher (bei *Robinia* bis 10fach).

Tabelle 13

	Robinia pseudoacacia (8. 10. 54)	Fraxinus americana (5. 10. 54)
Blattpreßsaft grüner Blätter*	3,35 mg/ml	3,38 mg/ml
Siebröhrensaft	13,52 mg/ml	8,48 mg/ml

* Die Menge der Ninhydrin-positiven Substanzen nimmt während der Vergilbung in den Blättern zunächst zu, um dann bis zum Blattfall immer geringer zu werden.

Als wichtigstes Ergebnis des Vergleiches der Stickstoffverbindungen und ihrer Konzentrationen im Blattpreß- und Siebröhrensaft ist zweifellos die Feststellung zu betrachten, daß auch hier — wie beim Zucker — der Übergang in die Leitbahnen nicht einfach einem Konzentrationsgefälle folgt, sondern die einzelnen Substanzen z. T. umgebaut und — zumindest zeitweise, sehr wahrscheinlich aber stets — aktiv in die Leitbahnen abgeschieden werden.

c) Die Phosphatfraktionen. Eine Gegenüberstellung der einzelnen Phosphatfraktionen im Blattpreßsaft und im gleichzeitig (in Höhe des Kronenansatzes) gewonnenen Siebröhrensaft desselben Baumes ergab im Sommer (11. 9. 54) bei *Robinia* folgende Werte (Tabelle 14).

Die Fraktion des leichthydrolysierbaren Phosphats, die dem Siebröhrensaft völlig fehlt (s. o.), ist im Blattpreßsaft demnach in recht ansehnlicher Menge vertreten. Wichtig scheint, daß die Gesamtmenge des Phosphats im Blattpreßsaft und Siebröhrensaft größenordnungsmäßig übereinstimmt, wobei die Menge des 7 min-Phosphates des Preßsaftes durch den Mehrgehalt des Siebröhrensaftes an anorg. Phosphat etwa kompensiert wird.

[1] Bei Angabe von Absolutwerten wurden die Absorptionswerte auf Leucin umgerechnet.

Im Herbst ändert sich auch hier das Bild wesentlich (Abb. 5): Während die Phosphatmengen im Blatt bekanntlich bei der Vergilbung stetig abnehmen (vgl. SEYBOLD, MEHNER u. BÜHLER 1950, FRIES 1952), steigt die Konzentration im Siebröhrensaft stark an.

Tabelle 14

	Anorganisches Phosphat	7 min-Phosphat	Gesamt-Phosphat
Baum I:			
Blattpreßsaft .	640 γ/ml	130 γ/ml	890 γ/ml
Siebröhrensaft .	760 γ/ml	—	855 γ/ml
Baum II:			
Blattpreßsaft .	605 γ/ml	130 γ/ml	840 γ/ml
Siebröhrensaft .	785 γ/ml	—	870 γ/ml

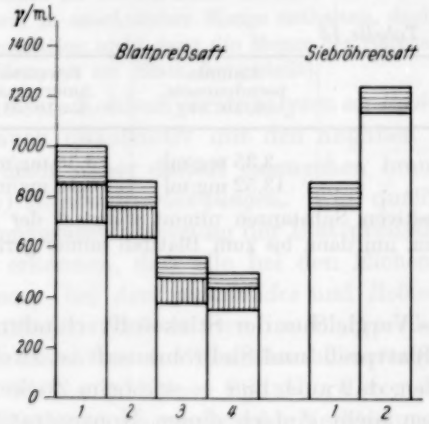

Abb. 5. Konzentrationen des anorg. Phosphats (unschraffiert), des 7 min Phosphats (senkrecht schraffiert) und des schwerhydrolysierbaren Phosphats (waagrecht schraffiert) im Blattpreßsaft und Siebröhrensaft von Robinia pseudoacacia. Blattpreßsaft: *1* = aus unverfärbten Blättern; *2* = aus Blättern, deren Interkostalfelder gelb verfärbt waren; *3* = aus bis auf die Hauptnerven gelb verfärbten Blättern; *4* = aus völlig verfärbten, aber noch voll turgeszenten Blättern. Siebröhrensaft: *1* = vom 12. 9. 54; *2* = vom 17. 10. 54

Auch die Phosphorverbindungen werden demnach wie die des Stickstoffs im Herbst gegen ein Konzentrationsgefälle vom Blatt n die Leitbahnen bewegt, so daß auch für diese Substanzen ein aktiver Sekretionsmechanismus gefordert werden muß (s. u.).

d) Der p_H*-Wert.* Im Gegensatz zu den p_H-Werten der Siebröhrensäfte, die immer im alkalischen Bereich liegen (s. o.), sind die Blattpreßsäfte stets ± sauer. Bei Robinia schwankte z. B. der p_H-Wert zwischen 5,4 und 5,9 und lag im Mittel von 10 Bestimmungen bei 5,6. Auf die Bedeutung dieses Gradienten werden wir noch zu sprechen kommen.

2. Die Beziehungen zum Honigtau

Seit den Untersuchungen von BÜSGEN (1891), ARNHART (1926), GEINITZ (1930) und RAWITSCHER (1933) weiß man mit Sicherheit, daß der seit alters her bekannte „Honigtau" von pflanzensaugenden Insekten abgeschieden wird und daß die reichlich diese zuckerhaltigen Exkrete absondernden Tiere speziell die Siebröhren anstechen. Bereits BÜSGEN (l. c.) hat auch die „Verschwendung" der Kohlenhydrate mit dem Bedürfnis der Tiere erklärt, die in ihrer Nahrungsquelle im Verhältnis zu den Zuckern stark zurücktretenden Stickstoffsubstanzen relativ anzureichern.

Es schien nun von Interesse, einmal zu prüfen, ob der Anteil der Stickstoffverbindungen im Honigtau tatsächlich wesentlich geringer ist als im Siebröhrensaft, aus dem er entsteht, ob also der Honigtauerzeuger wirklich in der Lage ist, die entsprechenden Verbindungen selektiv aus der ausgesaugten Lösung herauszuresorbieren. Setzt man die Menge der Ninhydrin-positiven Substanzen im Siebröhrensaft von *Hedera helix* und im Honigtau, der von einer auf dieser Pflanze saugenden Schildlaus (Coccide) erzeugt wird, in Beziehung zu den (nach vollständiger Hydrolyse erhaltenen) Mengen reduzierender Zucker der beiden Säfte, so erhält man folgende Werte:

Auf 1 g Zucker trafen im

Siebröhrensaft	Honigtau
23,8 mg	0,17 mg

Ninhydrin-positive Substanzen (auf Leucin umgerechnet). Das Verhältnis dieser Verbindungen beträgt demnach — auf gleiche Zuckermengen bezogen — im Siebröhrensaft gegen den Honigtau 140:1, oder, anders ausgedrückt, das Insekt reichert bei der Resorption diese Stoffe auf über 100fache Konzentration an.

3. Die Beziehungen zum Nektar

In den letzten Jahren wurde durch eine Reihe von anatomischen und physiologischen Untersuchungen, vor allem im Institute Frey-Wyssligs, sichergestellt, daß es sich beim Nektar um ausgeschiedenen Siebröhrensaft handelt (Frey-Wyssling u. Agthe 1950, Agthe 1951, Frei 1952, Zimmermann 1953). Eine genauere Analyse der Zuckerkomponenten des Nektars (Zimmermann) und der Physiologie der Sekretion (Frey-Wyssling, Zimmermann u. Maurizio 1954) zeigte weiter, daß die Saccharose des Siebröhrensaftes bei der Nektarbildung charakteristische Veränderungen erleidet und daß die Nektarien durchaus aktiv an der Sekretion beteiligt sind. Wir werden auf diese Befunde unten noch ausführlicher einzugehen haben. Hier soll nun über vergleichende Analysen von Nektar und Siebröhrensaft derselben Pflanzen, vor allem hinsichtlich des Gehaltes an organischen Stickstoffverbindungen und des Anteils der verschiedenen Phosphatfraktionen, berichtet werden.

Grundsätzlich ist dazu zu bemerken, daß die Angabe absoluter Konzentrationen der einzelnen Stoffe wie auch des Gesamttrockengewichts im unveränderten Nektar exakt kaum möglich ist; je nach der Ergiebigkeit der Sekretion ist die Zeit bis zum Austritt gewinnbarer und analysierbarer Nektarmengen und damit die Zeitdauer der Verdunstung des Nektarwassers verschieden lang, je nach der Luftfeuchtigkeit und der Temperatur auch die Intensität der Verdunstung verschieden stark.

Immerhin haben die zahlreichen Gesamtzucker-Analysen der verschiedenen Nektarsorten (Beutler 1930, Ewert 1940 u. a.), die mit Sicherheit aus phloëmversorgten Nektarien stammten, stets sehr hohe Zuckergehalte ergeben, die meist, wahrscheinlich aus dem eben erwähnten Grund, die entsprechenden Konzentrationen in den Siebröhren-

säften derselben Pflanzen übertreffen. Man kann aber wohl annehmen, daß die Gesamtzucker-Konzentration des Siebröhrensaftes bei der Nektarbildung nicht wesentlich verändert wird.

Wie steht es nun aber mit dem Verhältnis der Stickstoff- und Phosphorverbindungen zu dieser Zuckerkonzentration? Finden sie sich im Nektar in denselben Mengenanteilen wie in den Siebröhren wieder oder werden diese bei der Sekretion verschoben?

Wir verglichen zunächst die Mengen der mit der Ninhydrinreaktion faßbaren Substanzen im Siebröhrensaft und Nektar. Bei *Robinia* war leider zur Blütezeit (1. Junihälfte) noch kein Siebröhrensaft zu gewinnen; da aber die Konzentration der Stickstoffverbindungen während des ganzen Sommers ziemlich konstant bleibt (s. o.), ist auch mit ähnlichen Anteilen während der Blütezeit zu rechnen. Während wir somit etwa 5 mg Stickstoffsubstanzen/ml (auf Leucin umgerechnet) oder im Durchschnitt (bei 20% Saccharosegehalt) 25 mg je 1 g Zucker annehmen können — nur Größenordnungen brauchen uns hier zu interessieren —, finden sich im Nektar im Durchschnitt nur etwa 5 γ je 1 g Zucker, also nur etwa $^1/_{5000}$ der Konzentration im Siebröhrensaft.

Tabelle 15. *Robinia pseudoacacia*

	Siebröhrensaft	Nektar (17. 6. 55)
Zuckergehalt . .	20%	30%
Anorg. Phosphat	720 γ/ml	60 γ/ml
7 min-Phosphat	—	12 γ/ml
Gesamtphosphat	820 γ/ml	74 γ/ml
Gesamtphosphat je g Zucker . .	4,1 mg	0,2 mg

Ganz ähnliche Mengen (etwa 1 γ/ml) wurden auch im Nektar von *Abutilon striatum* und *Hoya carnosa* (der in relativ großen Mengen gewonnen werden kann) festgestellt.

Bemerkenswert ist der Befund, daß bei *Hoya* der Anteil der Ninhydrin-positiven Substanzen im Nektar bei älteren Blüten, die schon eine leichte Bräunung der Coronablätter zeigen und in der letzten Sekretionsphase stehen, beträchtlich zunimmt, und zwar bis 33 γ/ml, also auf über das 30fache der Normalkonzentration. Ganz offenbar vermindert sich mit dem Altern des Plasmas seine spezifische Filtrierfähigkeit.

Normalerweise werden aber die organischen Stickstoffsubstanzen nach unseren Befunden bei der Nektarsekretion fast quantitativ zurückgehalten.

Stellt man die Durchschnittswerte der *Phosphatmengen* im Siebröhrensaft von *Robinia* den entsprechenden Zahlen für den Nektar gegenüber (Tabelle 15), so zeigt sich, daß auch hier eine erhebliche Konzentrationsverminderung bei der Nektarbildung eintritt, die — auf gleiche Zuckermengen bezogen — für das Gesamtphosphat bis unter $^1/_{20}$ geht.

Beträgt demnach im Siebröhrensaft von *Robinia* die Molarität des Gesamtphosphates etwa $^1/_{100}$ bis $^1/_{200}$ (Saccharosemolarität etwa $^1/_2$),

so erniedrigt sie sich im Nektar auf ca. $^1/_{1300}$ (Zuckermolarität > 1). Hinzuweisen ist auf das Vorkommen geringer Mengen von leichthydrolysierbarem Phosphat im Nektar; es konnte auch bei *Abutilon*- (um 20 γ/ml) und *Hoya*-Nektar (um 10 γ/ml) nachgewiesen werden. Dagegen ist nicht sichergestellt und auch unwahrscheinlich, daß der Nektar nachweisbare Mengen schwerhydrolysierbaren Phosphates enthält.

Während der Siebröhrensaft mit den bisher behandelten Säften (Blattpreßsaft, Honigtau, Nektar) unmittelbar in Verbindung gebracht werden kann, hat er zu den im folgenden behandelten Säften (Blutungssaft, Gefäßsaft) nur indirekte Beziehungen. Ihr Gehalt an Kohlenhydraten und Phosphatverbindungen wurde jedoch ebenfalls untersucht, um die Vorstellung von den Konzentrationsbeziehungen dieser Stoffe in möglichst vielen Teilen der Pflanze zu vervollständigen.

Tabelle 16. *Gefäßsaft von Dioscorea batatas* (30. 8. 55)

Höhe über dem Boden	Phosphatgehalt
0,4—1 Meter .	59,4 γ/ml
1,1—1,8 Meter .	65,5 γ/ml
1,9—3,0 Meter .	60 γ/ml
3,1—4,1 Meter .	60,6 γ/ml

4. *Der Gefäßsaft*

Unter „Gefäßsaft" wollen wir hier den Inhalt der wasserleitenden Gefäße außerhalb der Zeit der Frühjahrsblutung verstehen. Er unterscheidet sich stofflich vom Frühjahrsblutungssaft vor allem durch das völlige Fehlen der Kohlenhydrate und meist auch der Aminosäuren; weder der abgepreßte Gefäßinhalt von *Robinia* und *Dioscorea* (s. u.) noch der vom Wurzeldruck bei *Sanchezia* und *Myriocarpa* gelieferte Saft enthalten auch nur Spuren dieser beiden Stoffgruppen. Auch organische Phosphorverbindungen fehlen den erwähnten Säften völlig.

Der Gehalt an anorganischem Phosphat betrug im Blutungssaft von *Myriocarpa* (im Mittel von 6 Bestimmungen) 127 γ/ml (das entspricht einer etwa $^1/_{750}$ molaren Lösung), bei *Sanchezia* (Mittel von 6 Bestimmungen) 95 γ/ml ($^1/_{1000}$ molare Lösung); die Konzentrationsdifferenzen der verschiedenen Proben waren dabei sehr gering ($\pm$ 2,5%).

Die Konzentration des anorganischen Phosphats im Gefäßsaft von *Dioscorea batatas* schwankte zwischen 45 γ/ml und 135 γ/ml, mit einem Mittel (aus 20 Bestimmungen) von 65 γ/ml.

Zur Feststellung eines evtl. Konzentrationsgradienten wurden die Gefäßinhalte verschiedener Sproßhöhen miteinander verglichen; eine Bestimmung gibt Tabelle 16 wieder.

Bei den 12 geprüften Sprossen konnte kein einheitlicher Gradient der Phosphatkonzentration im Gefäßsaft festgestellt werden; meist waren die Mengen in den verschiedenen Höhen etwa gleich groß (vgl. Tabelle).

Leider war aus keinem dieser Objekte, deren Gefäßinhalt verhältnismäßig leicht gewonnen und analysiert werden kann, Siebröhrensaft

durch Zapfung zu gewinnen, so daß ein unmittelbarer Vergleich der Phosphatkonzentrationen in den Siebröhren und Gefäßen nicht möglich war.

Es sollte deshalb die Phosphatkonzentration im Gefäßsaft von *Robinia*, dem Hauptobjekt unserer Siebröhrensaftuntersuchungen, geprüft werden.

Zur Gewinnung des Gefäßinhaltes wurden von 3jährigen Robinien astfreie Stammstücke von 3 cm Länge und 1,5—2,5 cm Durchmesser[1] entrindet, sofort mit einer Gummimanschette überzogen, möglichst schnell gewogen, in die Öffnung einer Saugflasche eingebracht, mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und schließlich zurückgewogen; die Gewichtsdifferenz gibt das Gesamtgewicht der abgesaugten Substanzen wieder. Die Saugflasche wurde dann bei 105° C zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen, quantitativ mit aqua dest. ausgespült und nach Trocknung zurückgewogen. Die Differenz dieser beiden Wägungen gab die Gesamtmenge der abgesaugten Salze. Die Menge des abgesaugten Wassers ließ sich nun durch die Differenz zwischen den Gesamtgewichtsverlust der Stammstücke bei der Saugung und dem Gewicht der Salze berechnen. Schließlich wurde die Phosphatmenge in der aus der Saugflasche gespülten Salzlösung bestimmt.

Die Konzentration des anorg. Phosphats im Gefäßsaft von *Robinia pseudoacacia* betrug (im Mittel von 30 Bestimmungen) 114 γ/ml (niederster Wert 70 γ/ml, höchster 152 γ/ml), das entspricht einer etwa $^1/_{800}$ molaren Lösung.

Gesetzmäßige Unterschiede der Konzentration in verschiedenen Stammhöhen ließen sich bei diesem Objekt ebenfalls nicht feststellen; ein Gradient scheint demnach auch hier nicht ausgeprägt zu sein.

Zunächst war versucht worden, den Gefäßinhalt durch Ausspülen mit einem Überschuß von aqua dest. zu gewinnen; die getestete Phosphatmenge sollte dann zu der durch die Bestimmung des Gefäßvolumens ermittelten Wassermenge der Gefäße in Beziehung gesetzt werden. Wir bekamen aber auf diese Weise Salzmengen, die weit höher lagen, als sie die Menge des Gefäßsaftes überhaupt lösen konnte, und erst recht höher als alle bekannten Angaben über die Gefäßwasserkonzentration (vgl. ANDERSSEN 1929).

So erhielten wir beim Durchspülen ähnlicher Stammzylinder, die bei der Bestimmung durch Absaugen etwa 110 γ/ml Phosphat im Gefäßsaft enthielten (s. o.), mit 200 ml aqua dest. Phosphatmengen von etwa 1000 γ/ml der leitenden Gefäße, also etwa die 10fache Konzentration. Auch die Gesamtmenge des Salzes erhöht sich beim Durchspülen mit 200 ml Wasser auf etwa das 4fache gegenüber den Werten des Saugverfahrens. Erhebliche Salzmengen erhielten wir auch, wenn wir nach dem Absaugen des Gefäßsaftes die leeren Gefäße mit aqua dest. nachspülten; bei Durchspülen mit 100 ml aqua dest. bei den von

[1] Bei *Robinia* sind nur die Gefäße des jüngsten Jahrringes an der Wasserleitung beteiligt, was sich nach Durchsaugen einer Farbstofflösung durch die Stammzylinder leicht feststellen läßt.

uns verwendeten Stammzylindern im Mittel von 10 Werten 800 γ/ml (niederster Wert 650 γ, höchster Wert 1000 γ). Diese Befunde können wohl nur mit der Annahme erklärt werden, daß sich ganz erhebliche Salzmengen in adsorptiver Bindung mit der Gefäßwand befinden und beim Durchspülen der Gefäße allmählich abgelöst werden.

Gestützt wird diese Ansicht durch den von uns bei dem später zu schildernden histochemischen Phosphatasenachweis erhobenen Befund, daß die vor Durchführung der Reaktion zu entfernenden Phosphate am hartnäckigsten an den Gefäßmembranen zu haften pflegen, die zugesetzten Schwermetallionen binden und deshalb nach der H_2S-Zugabe bei nicht genügender Auswaschung der Schnitte eine Schwärzung erfahren. Diese an den Gefäßwandungen adsorbierten Salzmengen stehen nun zweifellos in einem Adsorptions-Elutionsgleichgewicht mit den im Transpirationsstrom vorbeigeführten Stoffen: Bei Rückgang der Konzentration eines Ions in der strömenden Lösung (etwa infolge mangelnden Nachschubs aus dem Boden) wird entsprechend mehr in Lösung gehen und bei Zunahme der Konzentration im Strom werden größere Mengen an der Membran adsorbiert werden. Auf diese Weise kann eine gewisse Konzentrationshöhe (innerhalb bestimmter Grenzen) aufrechterhalten werden, wobei die *Gefäßmembranen als eine Art „Salzkonzentrations-Puffer"* betrachtet werden können.

Tabelle 17. *Dioscorea batatas (17. 6. 55), Phosphatmengen im Durchlauf*

	Sprosse mit dest. Wasser vorbehandelt		Sprosse normal	
	Sproß A	Sproß B	Sproß A	Sproß B
Unten 1 Meter	19 γ	12 γ	44 γ	37 γ
1 „	28 γ	12 γ	56 γ	32 γ
↓ 1 „	32 γ	28 g	62 γ	34 γ
Oben 1 „	37 γ	17 γ	53 γ	42 γ
Mittel	26,5 γ	17,25 γ	53,75 γ	38,25 γ

Wir haben diese Annahme durch einen weiteren Versuch gestützt: 2 *Dioscorea*-Sprosse wurden an ihrem unteren Ende unter aqua dest. abgeschnitten und zogen 48 Stunden (bei sonnigem Wetter) im Gewächshaus destilliertes Wasser durch ihre Gefäße.

Vergleicht man nun die Menge des durch Ausspülen von je 1 Meter langen Sproßstücken mit 200 l aqua dest. (nach Ausblasen der ursprünglichen Gefäßfüllung) erhältlichen Phosphats der so behandelten Pflanzen mit den Zahlen für Sprosse, die bis zuletzt mit den Wurzeln und damit mit der Bodenlösung in Verbindung gestanden, im Versuch aber gleich behandelt worden waren, so erhält man folgende Werte (Tabelle 17).

Die mit aqua dest. versorgten Sprosse enthalten demnach erheblich weniger auswaschbares Phosphat an den Membranen, was nach unserer Hypothese zu erwarten war.

Zweifellos sind die Austauschvorgänge zwischen Gefäßwasser und Gefäßwandung sehr komplex und bedürfen zu ihrer Klärung eingehender Untersuchungen[1].

Ein Vergleich der Phosphatkonzentrationen in den Gefäßsäften der von uns untersuchten Pflanzen zeigt einerseits charakteristische Unterschiede — hervorzuheben ist vor allem die Verringerung der Konzentration bei der mit hohen Transspirationsstrom-Geschwindigkeiten ausgestatteten Liane (vgl. PETRITSCHEK 1953) —, andererseits aber doch auch eine bemerkenswerte Übereinstimmung in der Größenordnung.

Führt man sich vor Augen, daß in den Gefäßsäften stets ein Überschuß von Calciumionen vorhanden ist, die unter diesen Bedingungen sich bildenden Calciumphosphate (vor allem wohl $CaHPO_4$) schwer löslich sind, der Gefäßsaft aber zweifellos eine echte Lösung und keine Suspension darstellt, so wird klar, daß der Gehalt der Gefäßsäfte an Phosphationen nicht über den einer gesättigten Lösung von $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ hinausgehen kann, meist aber tiefer liegen wird (Ca-Überschuß!). Eine solche enthält aber bei 20° C 0,020 g/100 g Lösungsmittel (D'ANS u. LAX 1949), d. h. auf PO_4^{---} umgerechnet 140 γ/ml. Unsere Mittelwerte (65 γ/ml bei *Dioscorea*, 95 γ/ml bei *Sanchezia*, 114 γ/ml bei *Robinia* und 127 γ/ml bei *Myriocarpa*) stimmen mit diesem Wert größenordnungsmäßig gut überein. Die (wenigen) Fälle, in denen nach unseren Analysen dieser Grenzwert von 140 γ/ml überschritten wurde (*Robinia:* Höchstwert 157 γ/ml), sind ein Hinweis darauf, daß wir es im Gefäßsaft mit komplizierteren Verhältnissen zu tun haben, als sie bei einer Einsalzlösung in aqua dest. vorliegen. So bewegt sich ja auch z. B. der p_H-Wert des Gefäßsaftes im leicht saueren Bereich, in unseren Untersuchungen zwischen 5,5 und 6,5. Immerhin dürfte aber außer Frage stehen, daß der Überschuß des Calcium-Ions im Transpirationsstrom gerade für die Phosphat-Ionenkonzentration von begrenzendem Einfluß sein kann.

Auf die in dieser Hinsicht völlig anders liegenden Verhältnisse im Assimilatstrom werden wir noch zu sprechen kommen.

5. Der Frühjahrsblutungssaft

Analysendaten für die Frühjahrsblutungssäfte der stark blutenden Holzgewächse *(Betula, Acer, Carpinus, Vitis)* liegen zwar reichlich vor (Zusammenstellung der älteren Arbeiten bei HEYL 1933; vgl. ferner LÖHR 1953, LUNDEGÅRDH 1955, MOTHES u. ENGELBRECHT 1952, WOLFFGANG u. MOTHES 1953, REUTER u. WOLFFGANG 1954), doch fehlen die uns in unserem Zusammenhang vor allem interessierenden Angaben über die Mengenbeziehungen der Kohlenhydrate und der Phosphorverbindungen.

[1] Eine Bearbeitung des Absorptions- und Austauschvermögens wichtiger Holzarten für verschiedene Salzlösungen ist derzeit im Forstbotanischen Institut München im Gange (W. MERZ).

Wie die Untersuchungen von HANES (1940) u. a. ergaben, erfolgt die Mobilisierung der pflanzlichen Reservestärke im allgemeinen ja nicht durch eine Hydrolyse, sondern durch eine Phosphorolyse, und die entstehenden Produkte sind dementsprechend keine Hexosen, sondern Hexosephosphate (z. T. wohl auch Saccharose, s. u.). Es war daher vor allem zu prüfen, ob der Blutungssaft Zuckerphosphate enthält.

Bei allen untersuchten Bäumen (s. Tabelle 18) ließ sich weder leicht- noch schwerhydrolysierbares Phosphat nachweisen, so daß das Vorhandensein von Zuckerphosphaten mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Die bei der Stärkephosphorolyse gebildeten Zuckerphosphate müssen daher vor dem Übertritt in den Blutungssaft einer Dephosphorylierung unterzogen werden, ganz ähnlich, wie dies in den Geleitzellen der Siebröhren der Fall ist. Auch hier ist demnach bei der Spaltung zunächst ein molares Verhältnis von Hexose: anorg. Phosphat (1:1) zu erwarten. Beim Übertritt dieser Spaltprodukte von den Speichergeweben in die Gefäße durch einfache Diffusion wäre ein ähnliches Verhältnis auch im Blutungssaft zu erwarten.

Die tatsächlichen Konzentrationsverhältnisse zeigt die folgende Tabelle (18).

Auch hier stehen die Phosphatmengen — wie im Siebröhrensaft — nicht in dem angedeuteten Verhältnis zu den Zuckerkonzentrationen, sondern sind ganz wesentlich geringer; im günstigsten Falle *(Acer saccharum)* sind Zucker und Phosphatmenge gegenüber dem Siebröhrensaft etwa gleichmäßig auf das 10fache verdünnt (Zuckerkonzentration von $^1/_2$ molar auf $^1/_{20}$ molar und Phosphat von etwa $^1/_{300}$ auf $^1/_{3000}$ molar), vielfach aber ist der Phosphatgehalt noch wesentlich stärker vermindert als die Kohlenhydratkonzentration.

Tabelle 18. *Chemische Zusammensetzung von Frühjahrsblutungssäften; 1955*

	pH-Wert	Trockengewicht %	Saccharose mol	Red. Zucker mol	Anorg. Phosphat mol
Betula pendula (18. 4.)	5,6	0,85	$^1/_{55}$	$^1/_{20}$	$^1/_{6000}$
Betula pubesc. (18. 4.)	5,2	0,9	$^1/_{57}$	$^1/_{19}$	$^1/_{4000}$
Carpinus betulus (20. 4.)	5,3	0,6	$^1/_{114}$	$^1/_{33}$	$^1/_{2000}$
Alnus glutin (18. 4.)	5,4	0,25	—	$^1/_{180}$	$^1/_{7100}$
Juglans regia (19. 4.)	5,3	0,6	$^1/_{110}$	$^1/_{380}$	$^1/_{6200}$
Fagus sylv. (20. 4.)	5,5	0,6	$^1/_{340}$	$^1/_{277}$	$^1/_{8350}$
Acer tat. (20. 4.)	5,5	1.45	$^1/_{26}$	$^1/_{474}$	$^1/_{2800}$
Acer camp. (20. 4.)	6,0	1,2	$^1/_{34}$	$^1/_{600}$	$^1/_{12800}$
Acer circinatum (20. 4.)	5,5	1,5	$^1/_{28}$	$^1/_{600}$	$^1/_{7700}$
Acer plat. (20. 4.)	6,0	1,25	$^1/_{34}$	$^1/_{330}$	$^1/_{8000}$
Acer pseudo.-plat. (20. 4.)	5,8	1,1	$^1/_{57}$	$^1/_{330}$	$^1/_{4700}$
Acer sacch. (20. 4.)	5,8	1,45	$^1/_{23}$	$^1/_{380}$	$^1/_{3000}$

(Jeweils Mittel aus 5 Bestimmungen).

Bemerkenswert ist die Sonderstellung der Ahorne bezüglich der Zuckerarten: sie enthalten viel Saccharose und wenig Hexosen, während die übrigen zuckerreichen Blutungssäfte meist wesentlich mehr Monosen besitzen. Auffallend ist der geringe Trockengewichts- und Gesamtzuckergehalt der Erle. Inwieweit das Überwiegen des Rohrzuckers im Blutungssaft der Ahorne sich in Beziehung bringen läßt zu dem Hervortreten des Allantoins bzw. der Allantoinsäure in der Fraktion der organischen Stickstoffverbindungen (MOTHES u. ENGELBRECHT, REUTER u. WOLFFGANG, l. c.), ist noch unklar.

Eine größenordnungsmäßig mit der Zucker- und Phosphatabnahme übereinstimmende Konzentrationsverringerung im Stammblutungssaft (der Wurzelblutungssaft ist wesentlich stickstoffreicher; MOTHES u. ENGELBRECHT, l. c.) gegenüber dem Siebröhrensaft zeigen übrigens auch die Stickstoffmengen: Während sie sich bei *Acer* im allgemeinen zwischen etwa 10 und 30 γ/ml (MOTHES u. ENGELBRECHT, l. c.) und bei *Carpinus*, *Betula*, *Alnus* und *Corylus* (allerdings mit erheblichen Abweichungen) zwischen 50 und 150 γ/ml (REUTER u. WOLFFGANG, l. c.) bewegen, erreichen sie in den Siebröhrensäften Konzentrationen von 500 bis 1000 γ/ml, also das 10- bis 20- (bis 100)fache. Allerdings sind die Schwankungen im Stickstoffgehalt der Blutungssäfte viel größer als im Kohlenhydratgehalt.

Zieht man aber in Betracht, daß die Strömungsgeschwindigkeit des Blutungssaftes in der Größenordnung des Transpirationsstromes liegen dürfte und damit die Schnelligkeit der Assimilatwanderung um etwa das 10fache übertrifft, so wird klar, daß die Frühjahrsblutung in ihrer Transportkapazität für organische Substanzen kaum hinter dem Assimilatstrom zurücksteht, zumal die leitende Querschnittsfläche im blutenden Holze die der Siebröhren übertreffen dürfte. Parasiten, die sich auf die Ausnutzung der Frühjahrsblutungssäfte ihrer Wirte spezialisiert haben, wie die *Lathraea*-Arten, können deshalb ebenso wie die Phloëm-Ausbeuter voll heterotroph werden und ihren gesamten Stoffbedarf aus den befallenen Pflanzen decken (ZIEGLER 1955a).

III. Zur Physiologie der Assimilatleitung und -sekretion

1. Zum Zuckereintritt in die Siebröhren

Wir wissen, daß die Saccharose die Wanderform der Kohlenhydrate in den Siebröhren darstellt; es erhebt sich nun zunächst die Frage, wo und auf welche Weise wird das Disaccharid synthetisiert und wie kommt es in die Siebröhren?

Prinzipiell sind für die Bildung des Rohrzuckers im Blatt verschiedene Wege denkbar und wahrscheinlich auch beschritten; zweifellos entsteht der Zucker schon an den Orten der Photosynthese aus deren Primärprodukten (s. u.), doch kann er aus Hexosen (nach deren Phosphorylierung) oder Hexosephosphat auch

in den nichtassimilierenden Geweben synthetisiert werden und fällt z. T. bei der Stärkehydrolyse an. Ob die fern von den Leitbahnen gebildete Saccharose im unveränderten Zustand im Symplasten bis zu den Leitgeweben wandern kann, ist derzeit nicht zu entscheiden (s. u.); verschiedentlich werden Hexosephosphate als die Wanderform der Zucker im Parenchym in Erwägung gezogen (WANNER 1953a).

Geht man von dieser letzten Annahme aus, so müßten die Übergangsgewebe zwischen dem Parenchym und den Siebröhren, vor allem wohl die Geleitzellen, für die Überführung dieser Zuckerphosphate in das Disaccharid verantwortlich sein. Die Synthese könnte dabei durch die Rohrzuckerphosphorylase katalysiert werden, wie sie von HASSID, DOUDOROFF u. BARKER (1944) aus *Pseudomonas saccharophila* isoliert und zur in vitro-Synthese von Rohrzucker verwendet und von TURNER (1953) in höheren Pflanzen (Erbsen) nachgewiesen wurde, und nach dem Schema verlaufen:

Glucose-1-phosphat + Fructose $\rightleftharpoons$ Rohrzucker + anorg. Phosphat. Die hohe Phosphataseaktivität der Geleitzellen könnte in diesem Falle für die Dephosphorylierung des aus den Blattgeweben herangeführten Fructosephosphats herangezogen werden.

Da das Ferment Glucosylgruppen überträgt (das Glucosephosphat zwischen C und O und nicht zwischen O und P spaltet; COHN 1949, HEHRE 1951), schien es denkbar, daß die Fructose als Acceptor durch andere Hexosen ersetzt werden könnte, die Geleitzellen also etwa bei Angebot von Galaktose statt Fructose nicht Saccharose, sondern ein Disaccharid aus Glucose und Galaktose, eine Glucosidogalaktose, bildeten.

Wir führten zur Prüfung dieser Frage folgenden Versuch aus: An 2jährigen Robinien wurde in etwa 1,5 Meter Höhe über dem Boden vorsichtig das Periderm abgeschabt und Würfel (2,5 cm mal 2,5 cm mal 1 cm) von 0,2 molarem Galaktoseagar (2,0% Agar) mittels paraffinierter Aluminiumschächtelchen an die Schabestelle angedrückt und mit einer Ölpapierbinde befestigt. In verschiedenen Zeiten (2, 4, 6, 12, 24, 32 und 48 Stunden) nach dem Anbringen wurde bei einem Teil der Bäume unter dem unteren Rand, bei einem anderen Teil ebensoweit über dem oberen Rand des aufgesetzten Würfels in der üblichen Weise Siebröhrensaft gezapft und papierchromatographisch untersucht.

Abb. 6 bringt eines der erhaltenen Chromatogramme. Es zeigt eindeutig das Vorhandensein von Galaktose im unten gezapften Siebröhrensaft des gefütterten Baumes, während bei den Zapfungen über dem Würfel nur Saccharose zu finden war (der Fremdzucker trat in unseren Versuchen frühestens 4 Stunden und bis höchstens 24 Stunden nach dem Fütterungsbeginn im Siebröhrensaft auf); ein Disaccharid der erwähnten Art ließ sich nicht nachweisen (allerdings stand eine entsprechende Testsubstanz nicht zur Verfügung: Lactose wandert langsamer als Saccharose, beide Disaccharide langsamer als die Monosen. Außer Galaktose und Saccharose war aber in den verschiedenen Laufmitteln kein weiterer Flecken festzustellen). Damit ist einerseits erneut bewiesen, daß es sich bei dem Zapfsaft tatsächlich um den Inhalt der Assimilatleitbahnen handelt, der unter den Bedingungen des Versuchs

nur abwärts wanderte, zum anderen aber, daß bei der Robinie Galaktose weder als Acceptor für einen in den Geleitzellen von einer Transglucosylase übertragenen Glucosylrest fungieren noch auch bei dem starken Angebot unseres Versuches vollständig in die Saccharosesynthese einbezogen werden kann. Ob die Galaktose wenigstens zum Teil nach entsprechender Umformung (evtl. über Triosen) zur Rohrzuckersynthese verwendet werden kann, ob also Teile der gefütterten Galaktose in der Wandersaccharose enthalten sind, ließe sich sehr einfach durch Verfütterung radioaktiver Galaktose entscheiden; leider stand sie uns bisher nicht zur Verfügung.

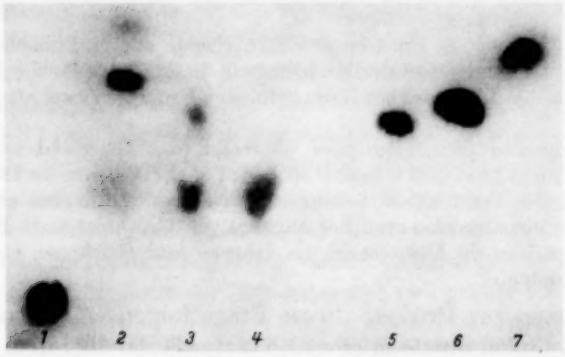

Abb. 6. Eindimensionales Papierchromatogramm der Siebröhrensäfte galaktosegefütterter Robinien. *1* = Lactose; *2* = (von unten nach oben) Saccharose, Glucose, Fructose; *3* = Siebröhrensaft der gefütterten Robinie, unter dem Agarwürfel gezapft; *4* = Siebröhrensaft der gefütterten Robinie, über dem Agar gezapft; *5* = Galaktose; *6* = Glucose; *7* = Fructose. (Zapfung 24 Stunden nach Beginn der Fütterung; entwickelt mit Anilinphthalat)

In größerem Umfang werden sicher freie Glucose und Fructose zu Rohrzucker synthetisiert werden und als solcher wandern können; dies konnte durch Fütterungsversuche bewiesen werden. Setzt man nämlich Agarwürfel mit 0,1 mol. Galaktose + 0,1 mol. Glucose, mit 0,1 mol. Galaktose + 0,1 mol. Fructose und mit 0,1 mol. Galaktose + 0,1 mol. Saccharose in der geschilderten Weise den Robinien auf, so erhält man im Siebröhrensaft zu allen Zapfzeiten, die überhaupt Fremdzucker erkennen lassen, immer mehr Galaktose als Glucose und Fructose (Abb. 7), während die gefütterte Saccharose stets vollständig im Rohrzucker des Siebröhrensaftes aufgeht. Ist die Galaktose selbst nur schwach im Siebröhrensaft vertreten, fehlen die äquimolar gebotenen beiden anderen Hexosen völlig (Abb. 8).

Der Befund bekräftigt nicht nur die — von vornherein wahrscheinliche — Annahme, daß Glucose und Fructose in größerem Umfang in die normale Transportform der Kohlenhydrate umgewandelt werden können als Galaktose, sondern macht auch wahrscheinlich, daß die beiden freien Monosen nicht die natürlichen Vorläufer der Wander-

saccharose in den Robiniensiebröhren darstellen; die nicht allzuhohe Konzentration freier Hexosen (0,1 molar) hätte sonst wohl vollständig zu Saccharose verarbeitet werden können.

Es ist aber nicht unwahrscheinlich, daß die Saccharosesynthese in den Geleitzellen, wenigstens zu einem mehr oder weniger großen Teil, auf einem anderen Wege verläuft, der von LELOIR u. CARDINI (1953) angegeben wird. Nach dieser Vorstellung reagiert Glucose-1-phosphat zunächst mit Uridintriphosphat unter Bildung von Uridindiphosphatglucose, deren Glucose entweder mit Fructose1-phosphat in Saccharosephosphat oder (weniger wahrscheinlich) mit

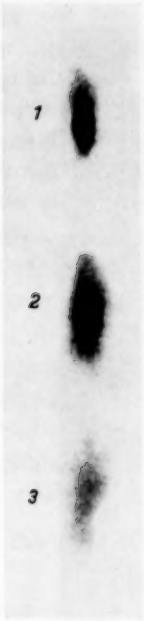

Abb. 7.
1 = Saccharose,
2 = Galaktose,
3 = Fructose

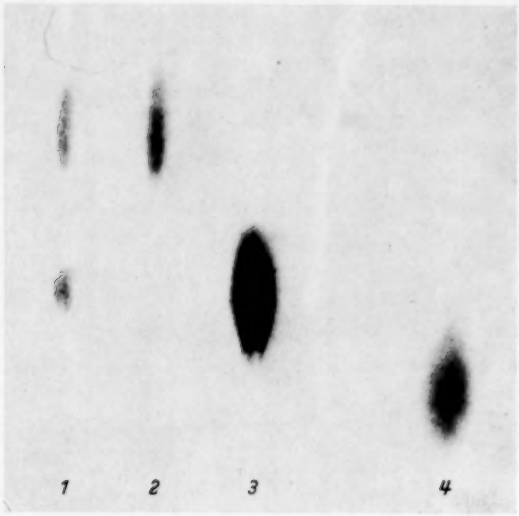

Abb. 8. 1 = Siebröhrensaft, unter dem Agar gezapft (oben Saccharose, unten Galaktose); 2 = Siebröhrensaft, über dem Agar gezapft (nur Saccharose); 3 = Testgalaktose; 4 = Testfructose

Abb. 7 und 8. Eindimensionale Papierchromatogramme des Siebröhrensaftes von mit Galaktose + Fructose gefütterten Robinien. (Zapfung jeweils 16 Stunden nach Fütterungsbeginn; entwickelt mit Anilinphthalat)

freier Fructose in Saccharose übergeht. In diesem Falle hätte die Geleitzellenphosphatase das Saccharosephosphat zu spalten und die Saccharose in Freiheit zu setzen (s. u.).

Der Übertritt der gebildeten Saccharose von den Geleitzellen in die Siebröhren scheint durch eine aktive Sekretionsleistung und nicht durch eine einfache Diffusion bewerkstelligt zu werden; wir werden darauf noch zurückkommen.

2. Der Zuckereintritt in den Frühjahrsblutungssaft

Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß sich auch im Frühjahrsblutungssaft keine Zuckerphosphate finden, obwohl die Stärkemobilisierung wahrscheinlich zunächst, wenigstens zum Teil, zu Hexose-

phosphaten führen wird. Diese Phosphorsäureester müssen daher vor Abscheidung der freien Hexosen gespalten werden (die vor allem bei den Ahornen im Blutungssaft überwiegende Saccharose geht wohl zum größten Teil als solche aus der Stärkemobilisierung hervor; BOIS u. NADEAU 1938). Es schien daher angebracht, nach einer ähnlichen Phosphataseaktivität einzelner lebender Elemente des Holzes Ausschau

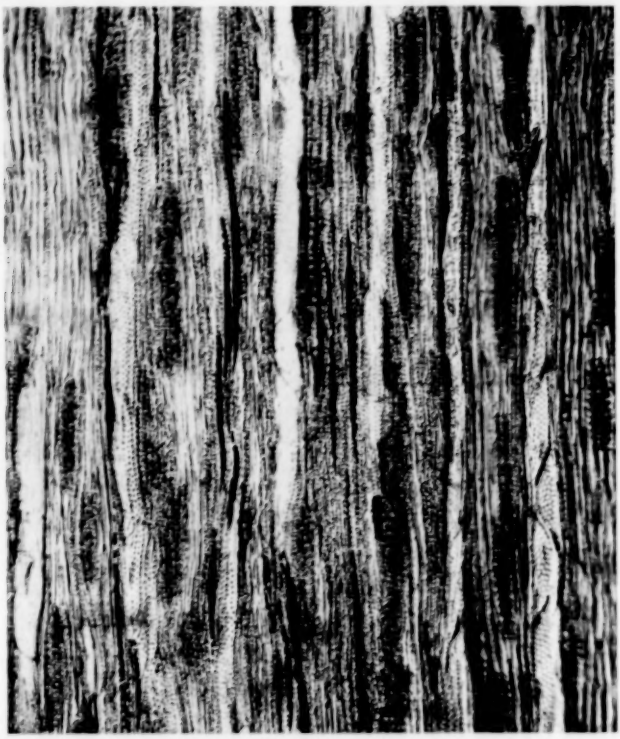

Abb. 9. Histochemische Lokalisierung der sauren Phosphatase im radialen Längsschnitt durch das Holz des Spitzahorns. Aktive Zellen geschwärzt. (Vergr. 90mal)

zu halten, wie sie für die Rinde in den Geleitzellen der Siebröhren nachgewiesen worden ist.

Wir verwendeten zu unserer Untersuchung 5jährige Stämmchen des Spitzahorns (*Acer platanoides*), die mit dem Mikrotom in Schnitte von etwa 30 μ Dicke zerlegt wurden. Der histochemische Nachweis der sauren Phosphatase erfolgte nach der Vorschrift von GLICK (1949; Einzelheiten s. BAUER 1953).

Die Reaktion ergab in den äußeren beiden Jahrringen eine hohe Aktivität der sauren Phosphatase in einzelnen lebenden und stärkespeichernden Holzparenchymzellen, die sich sonst weder in ihrer Form noch in ihrem Plasma- und Stärkegehalt von anderen Zellen ihrer Art unterschieden (Abb. 9 und 10). Die phosphataseaktiven Zellen bilden

dabei ein einigermaßen regelmäßiges Muster, das auf Längs- und Querschnitten in entsprechender Weise zutage tritt. Die Kontrollen, bei denen die Tätigkeit der Phosphatase durch Zusatz von Fluorid zur Substratlösung (ad $^1/_{100}$ molar) gehemmt worden war, zeigen die Reaktion nicht.

Die fermentaktiven Zellen finden sich bevorzugt in der Nähe der Gefäße; sie dürften für die oben geforderte Reaktion, also die Dephosphorylierung der bei der Stärkephosphorolyse (beim Ahorn in geringerer Menge) entstehenden Hexosephosphate, evtl. auch von Saccharosephosphat, und wahrscheinlich auch für die Abscheidung der Zucker in die Gefäße verantwortlich sein.

[Eine vorläufige Mitteilung dieser Ergebnisse findet sich bei ZIEGLER (1955b)].

Im Stammholz der nichtblutenden Esche (Fraxinus excelsior L.), Eiche (Qu. robur) und Robinie konnten ähnliche phosphataseaktive Elemente nicht nachgewiesen werden.

Abb. 10. Wie Abb. 9. (Vergr. 500mal)

3. Zur Zuckerabscheidung im Nektar

Da es sich, wie erwähnt, zumindest bei der Abscheidung der Zucker in die Siebröhren (vielleicht auch bei der in die Gefäße) um eine aktive Drüsentätigkeit der Geleitzellen (bzw. einzelner Holzparenchymzellen) zu handeln scheint, gewinnen für die Klärung dieser Leistung alle Befunde, die über den Sekretionsmechanismus der bekanntesten pflanzlichen Zuckerdrüsen, der Nektarien, erhoben werden, besondere Bedeutung. Da zudem die Nektarien — im Gegensatz zu den Geleitzellen — von ihrer Umgebung isoliert und ihre Funktionen dann unbeeinflußt von Nachbargeweben untersucht werden können, dürfte eine eingehendere Analyse ihrer Tätigkeit wichtige Ansatzpunkte für die Klärung der Kohlenhydratumsätze in den Geleitzellen des Phloëms vermitteln.

Wie bereits erwähnt, haben die Untersuchungen der letzten Jahre einerseits gezeigt, daß die Kohlenhydrate des Nektariums vom Phloëm geliefert werden und andererseits klargestellt, daß das Nektariengewebe aktiv an dem Umbau und der Sekretion der zugeführten Zucker beteiligt ist.

Da nun anzunehmen ist, daß die Saccharose bei der Entnahme aus den Siebröhren wenigstens zum Teil wieder in phosphorylierte Verbindungen übergeführt wird (s. u.), der Nektar aber, wie oben gezeigt wurde, nur geringe Mengen 7 min-Phosphat, weit überwiegend aber freie Zucker enthält, lag es nahe, auch im Nektarium nach dem Vorhandensein einer Phosphatase zu suchen, die eine entsprechende Spaltung zu katalysieren vermöchte.

Der histochemische Nachweis der sauren Phosphatase (nach der oben angeführten Methode) an Schnitten durch das Kelchblattnektarium

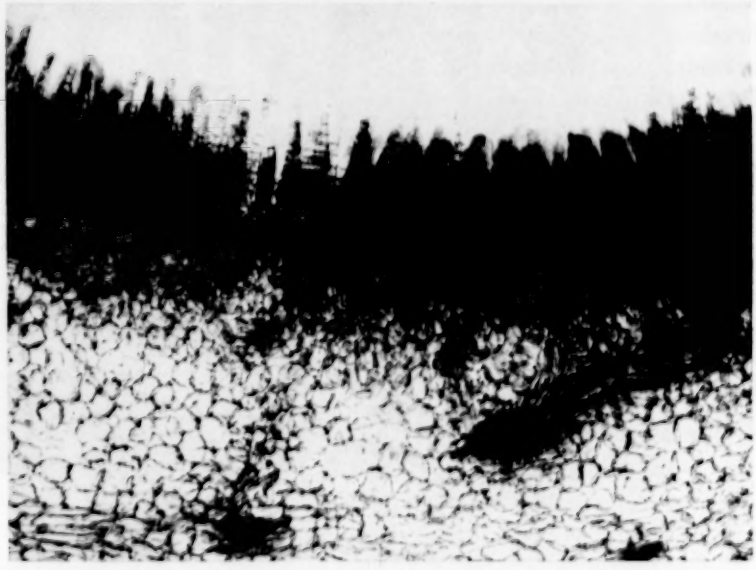

Abb. 11. Histochemischer Nachweis der sauren Phosphatase im Kelchblattnektarium von Abutilon striatum. Aktive Gewebe geschwärzt. (Vergr. 80mal)

von *Abutilon striatum* ergab eine hohe Aktivität in den Leitbündelscheiden, im Drüsengewebe und in der Palisadenepidermis (Abb. 11).

Das Nektariengewebe ist demnach wie die Geleitzellen der Siebröhren seiner fermentativen Ausstattung nach durchaus in der Lage, die Spaltung der ihm zugeführten Zuckerphosphate durchzuführen.

Stützt bereits dieser Befund die FREY-WYSSLINGsche Anschauung von der physiologischen Aktivität der Nektarien, so wird diese besonders deutlich bei einer Prüfung des Sauerstoffverbrauches des Drüsengewebes während der Sekretion und einer Untersuchung der Beeinflussung der Sekretionsleistung durch spezifische Stoffwechsel-Inhibitoren.

Als Versuchsobjekt dienten die Kelchblattnektarien von *Abutilon striatum*; die Messung des Sauerstoffverbrauches erfolgte manometrisch. Beim Vergleich des Sauerstoffverbrauches von Nektarien mit demjenigen des übrigen Kelchblattgewebes wurden die Drüsengewebe mit einer Rasierklinge von ihrer Unterlage

abgehoben und jeweils die 5 Nektarienlappen einer Blüte in einen Atmungstrog, die Kelchblattlaminae über den Drüsen in ein zweites Gefäß gegeben. Die Tröge waren mit einem Filtrierpapierboden ausgelegt, der mit einer Zunge in den Mitteleinsatz tauchte, in den je 0,7 ml m/15 Phosphatpuffer vom p_H 6,6 gefüllt worden waren. Auf diese Weise wurde eine dauernde gleichmäßige Befeuchtung auch bei längerer Versuchsdauer gewährleistet, ohne daß die atmenden Gewebe durch die Suspension in einer Flüssigkeit an ihrem Gasaustausch behindert gewesen wären. Absorbiert wurde mit 0,3 ml n/1 KOH im Seitenstutzen; die Absorptionsfläche wurde durch einen Filtrierpapierstreifen vergrößert. Die Versuchstemperatur betrug 25° C.

Der Vergleich des Sauerstoffverbrauches von Nektarien- und Kelchblättern wurde für 5 verschiedene Entwicklungsstadien der Blüten durchgeführt:

Stadium 1: Knospen von 1,0 cm Länge (ohne Blütenstiel) und 0,5 cm (maximaler) Breite.

Stadium 2: Knospen von 1,3 cm Länge und 0,7 cm Breite.

Stadium 3: Knospen von 1,7 cm Länge und 0,9 cm Breite.

Stadium 4: Blüte voll erblüht.

Stadium 5: Kronblätter gewelkt.

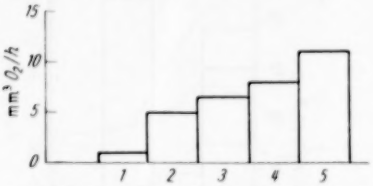

Abb. 12. Differenz im stündlichen Sauerstoffverbrauch von Nektarien- und Kelchblattgewebe von Abutilon striatum (Erklärung im Text)

In Stadium 3, 4 und 5 sezernierten die Nektarien.

Trägt man die Differenz des stündlichen Sauerstoffverbrauches von je 10 mg Trockengewicht zwischen Nektarien- und Kelchblattgewebe in den verschiedenen Stadien an, so erhält man Werte, die Abb. 12 wiedergibt.

Es ist ersichtlich, daß der Sauerstoffverbrauch des Nektariums stets über dem der umliegenden Gewebe liegt, die höchsten Werte der Differenz aber gerade während der Sekretionszeit erhalten werden. Zweifellos ist die Nektarabscheidung demnach ein aktiver Prozeß, der durch erhöhte Stoffwechselleistung bestritten werden muß.

[Eine vorläufige Mitteilung über diese Ergebnisse findet sich bei Ziegler (1955c)].

In Übereinstimmung mit diesen Befunden steht auch das Ergebnis der Untersuchungen über die Beeinflussung der Sekretion durch Stoffwechselgifte.

Dazu wurden — wie in den Atmungsversuchen — mit einer Rasierklinge von ihrem Traggewebe abgehobene Nektarienlappen in Glasschälchen mit ihrer Unterseite auf die Oberfläche einer 5%igen Saccharoselösung gebracht, der bei den Vergiftungsversuchen entweder Kaliumfluorid (ad $^1/_{50}$ molar) oder 2,4-Dinitrophenol (Na-Salz; ad 10^{-5} molar) zugesetzt worden war. Es wurde dabei so verfahren, daß jeweils die 5 Nektarienlappen einer Blüte einzeln auf die verschiedenen Ansätze verteilt wurden, so daß die Beschickungen weitgehend in ihrem physiologischen Ausgangszustand übereinstimmten. Der sezernierte Nektar wurde mit

einer graduierten Glaskapillare aufgenommen, die einen Mengenvergleich erlaubte; die qualitative Untersuchung erfolgte papierchromatographisch.

Während sich auf den Giftlösungen die Zuckerkonzentrationen des abgeschiedenen Nektars (nach dem Fleckenvergleich auf den Chromatogrammen) nicht erkennbar änderten, wurde die Menge des Sekretes von den Giften stark und charakteristisch beeinflußt (Abb. 13).

Das Fluorid zeigte dabei sofort eine hemmende Wirkung, die sich weiterhin verstärkte und nach etwa 30 Stunden die Sekretion völlig lahmlegte; das Dinitrophenol dagegen förderte zunächst die Sekretion, um dann auch eine zunehmende Hemmwirkung zu entwickeln.

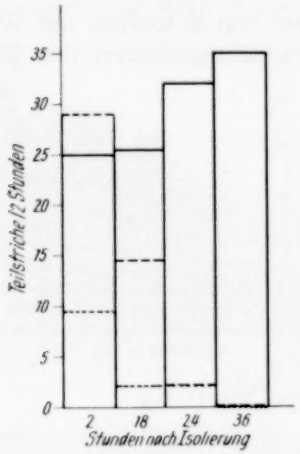

Abb. 13. Menge des abgeschiedenen Nektars aus dem Kelchblattnektarium von Abutilon striatum zu verschiedenen Zeiten nach der Isolierung. Ausgezogene Begrenzung: Nektarien auf 5%iger Saccharoselösung; gestrichelt: Nektarien auf 5%iger Saccharoselösung + 2,4-Dinitrophenol; punktiert: Nektarien auf 5%iger Saccharoselösung + Kaliumfluorid)

Gerade die anfängliche Steigerung der Nektarabscheidung durch das Dinitrophenol läßt an eine enge Verknüpfung des Vorganges mit Atmungsprozessen denken; bekanntlich fördert die Verbindung in geringen Konzentrationen die Atmung, die sie in höheren hemmt. In den isolierten Nektarien erreichte dann das Dinitrophenol erst nach einiger Zeit die hemmende Konzentration. Allerdings ist vorläufig eine weniger spezifische Wirkung des Giftes auf den Stoffwechsel des Drüsengewebes nicht streng auszuschließen und sind zur Klärung weitere Untersuchungen erforderlich.

Die Tatsache, daß wohl die Menge, nicht aber die Konzentration des Nektars von den Giften beeinflußt wird, läßt schließen, daß Zucker- und Wasserabscheidung in ähnlicher Weise und in gleichem Ausmaß durch eine aktive Stoffwechselleistung bewerkstelligt werden, das Wasser also nicht mehr oder minder passiv durch den abgeschiedenen Zucker nachgesogen wird, wie verschiedentlich angenommen (vgl. PFEFFER 1897, PANKRATOVA 1950).

Wie die Untersuchungen von FREY-WYSSLING, ZIMMERMANN u. MAURIZIO (1954) gezeigt haben, werden Glucose und Fructose bei der Fütterung isolierter Nektarien vor ihrer Abscheidung zum Teil in Saccharose übergeführt, während Arabinose unverändert sezerniert wird. Nun ist zur Knüpfung der Disaccharid-Bindung zwischen freien

Hexosen Energie erforderlich; es stand daher zu erwarten, daß bei Zugabe von Glucose und Fructose, die in den Stoffwechsel des Nektariums einbezogen werden können, der Sauerstoffverbrauch stärker ansteigt als bei „Fremdzuckern", wie Arabinose und Galaktose.

Bei den hier angestellten Experimenten wurde im allgemeinen nach dem oben beschriebenen manometrischen Verfahren gearbeitet. Die Objekte kamen aber in den Trögen auf einen Filtrierpapierboden, der mit 0,2 ml m/15 Phosphatpuffer getränkt, mit dem Mittelstutzen jedoch nicht verbunden war. In diesem Mitteleinsatz befanden sich 0,3 ml n/1 KOH. In die seitlichen Ansatzstutzen kamen 0,3 ml 1%ige Zuckerlösung (in m/15 Phosphatpuffer) bzw. in den Kontrollen dieselbe Menge Phosphatpuffer. Abgelesen wurde in 30 min Abstand; der Zuckrezusatz erfolgte nach einstündiger Leeratmung.

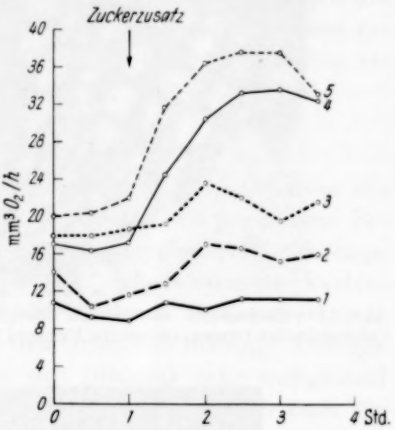

Abb. 14. Sauerstoffverbrauch der Kelchblattnektarien von Abutilon striatum bei Fütterung mit verschiedenen Zuckern: 1 = Kontrolle; 2 = Arabinose; 3 = Galaktose; 4 = Glucose; 5 = Fructose

Abb. 14 gibt die erhaltenen Werte wieder. Es ist deutlich, daß Galaktose und Arabinose, die im Nektar unverändert abgeschieden werden, den Sauerstoffverbrauch in ungleich geringerem Ausmaß steigern als Glucose und Fructose, bei denen der Anstieg zudem sofort einsetzt.

Auch hier ist die Ähnlichkeit zu den Verhältnissen bei der Zuckerabscheidung ins Phloëm offenbar; wir werden darauf noch zu sprechen kommen.

4. *Kohlenhydrattransport* und *Calciumhaushalt*

Wie wir gesehen haben, sind die wichtigsten Schaltstationen des Kohlenhydrattransportes (Geleitzellen, Holzparenchymzellen und Nektarien) stets durch eine hohe Aktivität der Phosphatasen ausgezeichnet. Führt man sich nun vor Augen, daß alle Fermente des Phosphorsäure-Umsatzes durch Ca^{++}-Ionen spezifisch gehemmt werden (vgl. McElroy u. Nason 1954), so wird man das gehäufte Vorkommen von Calciumoxalatkristallen gerade in der Nachbarschaft dieser Gewebe oder auch in ihnen selbst als physiologisch zweckmäßig betrachten müssen. Sowohl das Calcium-Ion als auch das die Fermente des Phosphorsäurestoffwechsels ebenfalls hemmende Oxalat-Ion werden auf diese Weise in eine fermentchemisch unwirksame Form gebracht.

Abb. 15 und 16 geben je ein Beispiel für die Häufung der Calciumoxalat-Drusen im Phloëm und im Nektarium.

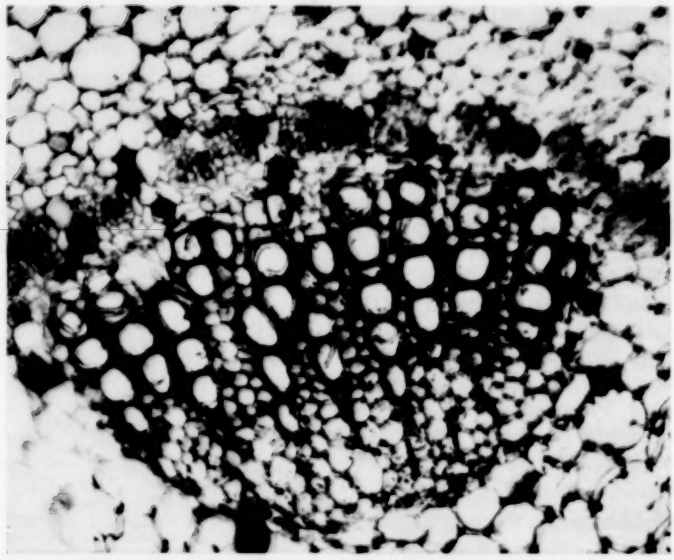

Abb. 15. Querschnitt durch den Blattstiel von Myriocarpa cordifolia. Häufung der Calciumoxalat-Drusen (schwarze Flecken) im Phloëmteil des Leitbündels. (Vergr. 135mal)

Abb. 16. Querschnitt durch das Kelchblattnektarium von Abutilon striatum. Schwarze Flecken: Calciumoxalat-Drusen. Die Pfeile bezeichnen Ausfällungen von $Mg(NH_4)PO_4$, die in Ammoniakatmosphäre entstanden sind

Dieselben enzymatischen Reaktionen, die von den Calcium- (und Oxalat-)Ionen gehemmt werden, erfahren von Mg^{++}-Ionen eine spezifische Förderung; es lag daher nahe, in den phosphataseaktiven Geweben

besonders reichlich Mg^{++} zu vermuten. Da die Nektarien sehr reich an Phosphat sind (KÜHN 1954), genügt es zum histochemischen Nachweis des Mg-Ions durch Ausfällung als $Mg(NH_4)PO_4$, Nektarienschnitte einige Minuten in Ammoniakatmosphäre zu bringen. Abb. 16 zeigt, daß das *Abutilon*-Nektarium tatsächlich reich an Magnesium-Ionen ist. Es ist aber darauf hinzuweisen, daß für die Förderung der Phosphorylierungsreaktionen nicht so sehr der absolute Mg-Ionengehalt als das Verhältnis von Mg-Ionen zu Ca-Ionen ausschlaggebend ist; die Umsetzungen der Drüsengewebe können daher auch ohne Mehrgehalt an Mg-Ionen gefördert sein, wenn nur die Konzentration der Ca-Ionen stärker erniedrigt ist.

C. Diskussion

Betrachten wir die Ergebnisse, welche die stoffliche Analyse des Assimilatstromes bisher gezeitigt hat, so scheint die wichtigste Erkenntnis zu sein, daß es sich bei den in den spezifischen Leitbahnen transportierten organischen Substanzen um relativ wenige Verbindungen, spezifische Transportstoffe, handelt, deren Konzentration in den Siebröhren meist höher liegt als an den Orten der Bildung. Dies gilt nicht nur für die Kohlenhydrate, wo sich offenbar sehr weitgehend die Saccharose als Transportform durchgesetzt hat, sondern auch für die Aminosäuren, unter denen bevorzugt die Glutaminsäure und Asparaginsäure in den Siebröhren wandern.

In welchem Umfang der Rohrzucker, der bei der Photosynthese als erster nichtphosphorylierter Zucker entsteht (CALVIN u. BENSON 1949), als solcher von den Stätten der Bildung durch die Gewebe des Blattes in die Leitbahnen gelangt, ist derzeit nicht zu überblicken (s. o.); immerhin scheint festzustehen, daß das Disaccharid im Blatt besonders leicht verschiebbar ist und markierte Saccharose schnell in den Leitbahnen erscheint (VERNON u. ARONOFF 1952, KURSANOV, TURKINA u. DUBININA 1953, KURSANOV 1954, TURKINA 1954). Es ist also denkbar, daß die Verbindung im allgemeinen ohne tiefgreifenden Umbau bis in die Siebröhren gelangt, wobei allerdings in den Übergangsgeweben zu den leitenden Elementen ein Drüsenmechanismus wirksam werden muß, der für die beträchtliche Konzentrationserhöhung verantwortlich ist.

Für eine derartige Leistung kommen wohl vor allem die Geleitzellen in Betracht, deren zell- und stoffwechselphysiologische Sonderstellung bereits vielfach Erwähnung fand: Sie speichern bevorzugt Fluorochrome (SCHUMACHER 1933) und Sulfosäure-Farbstoffe (COLLANDER u. HOLMSTRÖM 1939), reduzieren besonders stark Triphenyltetrazoliumchlorid (BAUER 1953, CURRIER, ESAU u. CHEADLE 1955), besitzen, wie bereits mehrfach erwähnt, eine besonders hohe Phosphataseaktivität, sind

plasmareich und in der Umgebung funktionierender Siebröhren besonders großkernig (vgl. RESCH 1954).

Es scheint nicht ausgeschlossen, daß der Mechanismus der Zuckerakkumulation in die Siebröhren recht weitgehend mit den Verhältnissen in der Darmwand der Säugetiere übereinstimmt. Hier sind phosphorylierende und dephosphorylierende Fermente in bilaminarer Verteilung nachgewiesen (JOHNSON u. KUGLER 1953); die Aufnahme der Hexosen aus dem Darmlumen ist mit einer Phosphorylierung verbunden, die entstandenen Zuckerphosphate durchwandern die Darmwand und werden vor Eintritt in die Pfortader dephosphoryliert. Auf diese Weise werden stets entsprechende Konzentrationsgefälle aufrechterhalten. Bei den Geleitzellen könnte man daran denken, daß die freie, von den Blattgeweben herangeführte Saccharose bei Eintritt in Saccharosephosphat übergeführt, als solches transportiert und vor Übertritt in die Siebröhren durch die Phosphatase gespalten wird.

Zweifellos können aber auch andere Zucker (vor allem Glucose und Fructose) und Zuckerverbindungen (vor allem Zuckerphosphate) nach ihrem Umbau in Saccharose aus dem Blatt in die Leitbahnen gelangen; die Fähigkeit zur Rohrzuckersynthese aus diesen Bausteinen ist wohl den meisten oder allen Blattzellen eigen, doch ist es nicht ausgeschlossen, daß auch hier die Geleitzellen eine besondere Aktivität besitzen (s. o.).

Bei den Aminosäuren, die in ihrer Konzentration in den Siebröhren gegen die Saccharose sehr stark zurücktreten, scheinen die Verhältnisse der Abscheidung in die Siebröhren prinzipiell ähnlich zu liegen; auch hier gehen die bevorzugten Wanderformen Glutaminsäure, Asparaginsäure (und Alanin) bereits als mengenmäßig hervortretende Verbindungen (neben Saccharose) aus den Umsetzungen der Photosynthese-Primärprodukte hervor, und zwar vor allem aus der Veratmung der Sedoheptulose, einer Heptose, die als eines der ersten Kohlenhydrate bei der Assimilation gebildet wird, im Dunkeln (TOLBERT u. ZILL 1954). Aber auch beim Übertritt der Aminosäuren in die Siebröhren ist — zumindest im Herbst — ein aktiver Mechanismus zu fordern, der den teilweisen Umbau des herangeführten Materials und den Konzentrationshub zu den Siebröhren bewirkt.

Es ist dabei nicht daran zu zweifeln, daß die Abscheidung der verschiedenen Stoffgruppen und des Wassers (s. u.) in die Leitbahnen durch ganz verschiedene Prozesse in den Siebröhrenscheiden bewerkstelligt wird, ganz ähnlich wie der Transport im Parenchym unabhängig erfolgt und von ganz verschiedenen enzymatischen Vorgängen gesteuert wird (ARISZ; Zusammenfassung 1952).

Dafür spricht auch der Befund, daß sich der Zuckerumsatz der Geleitzellen sehr weitgehend mit dem der Nektarien, der auffallendsten Zuckerdrüsen der höheren Pflanzen, vergleichen läßt, während das

Schicksal der Aminosäuren in beiden Geweben sehr verschieden ist. Sowohl Geleitzellen als auch Nektarien sind cytologisch als echte Drüsen gekennzeichnet (plasmareich, großkernig), weisen eine hohe Phosphataseaktivität auf und sind zur Saccharosesynthese befähigt; die Ableitung des organischen Materials aus dem Blatt und die Nektarsekretion werden durch 2,4-Dinitrophenol in atmungsfördernden Konzentrationen beschleunigt (Assimilatleitung: Vernon u. Aronoff l. c. Nektarien: s. o.), in höheren Konzentrationen und durch andere Atmungs- (Fluorid in Nektarien: s. o.) und Phosphorylierungsgifte (Phlorrhizin bei der Assimilatleitung: Bauer 1953) gehemmt.

Es ist daher keine Frage, daß auch den funktionierenden Geleitzellen eine besonders intensive Atmung zuzuschreiben ist, wie dies in dieser Arbeit für die sezernierenden Nektarien, von Arisz u. Mitarbeitern (1955) auch für die Salzdrüsen von *Statice* nachgewiesen wurde.

Diese „Drüsenatmung" der Geleitzellen dürfte auch für den gesteigerten Sauerstoffverbrauch des Phloëms bei Zuckerfütterung (Kursanov 1952, Kursanov u. Turkina 1952a und b, Turkina u. Dubinina 1954) verantwortlich sein; die russischen Forscher haben ja stets mit isolierten Gesamtleitbündeln (einschließlich der Geleitzellen!) gearbeitet und die Übertragung des Stoffwechsels dieses Gewebekomplexes und seiner Änderungen auf die Siebröhren, wie sie von Kursanov und seinen Mitarbeitern vorgenommen wird, ist sicher unberechtigt, zumal die reifen Siebröhren infolge des Fehlens der wichtigsten Fermente der Glykolyse (Wanner 1953b) gar nicht in der Lage sind, eine Atmung durchzuführen.

Wie erwähnt, unterscheiden sich die beiden Prozesse der Sekretion von Nektar und von Transportstoffen in die Siebröhren in bezug auf die *Aminosäuren* grundlegend: Während diese in größerem Umfang in die Leitbahnen übertreten, werden sie bei der Nektarabscheidung (in ähnlicher Weise wie das Phosphat) fast vollständig zurückgehalten. Für das Verständnis des Sekretionsmechanismus der Nektarien scheint dies von Bedeutung zu sein: Es kann sich nicht einfach um polare Unterschiede in der Durchlässigkeit des Plasmas der Drüsenzellen für die im Zellinneren gelösten Stoffe handeln (vgl. Pfeffer 1897), die durch dieses „Leck" an der Nektarienaußenseite austräten; wir haben es bei der Nektarsekretion vielmehr mit einer ganz spezifischen Zukker- (und Wasser-)abscheidung zu tun, deren Mechanismus im einzelnen noch dunkel ist. Ihre Klärung wird sehr wahrscheinlich auch wesentlich zur Vertiefung unserer Kenntnisse über den Eintritt der Kohlenhydrate in die Leitbahnen beizutragen vermögen.

Während demnach der Übertritt der elektroneutralen Kohlenhydrate und wohl auch der der Aminosäuren in die Leitbahnen im wesentlichen

enzymatisch gesteuert wird, ist beim Eintritt von Ionen und Wasser durchaus an eine Beteiligung elektrischer Kräfte zu denken. Es ist keine Frage, daß das Plasma der reifen Siebröhren mit ihrem stets alkalischen Zellsaft völlig andere Eigenschaften, vor allem auch einen anderen Ladungszustand, haben muß als das Plasma der Geleitzellen mit den sauren Zellsäften. Zwischen beiden Elementen besteht sicher eine erhebliche Potentialdifferenz.

Wie NOLD (1934) für die *Utricularia*-Blase zeigte, wird der Wassertransport durch die Blasenwandung nach außen, der das durch den Schluckakt gefüllte Organ wieder „spannt", durch elektrische Kräfte bewerkstelligt; auch hier ist die Flüssigkeit im Innern der Blase sauer, die nach außen sezernierte alkalisch (Potentialdifferenz etwa 40 mV; Außenseite negativ). Man kann daher beim Eintritt des Wassers in die Siebröhren durchaus ähnliche Kräfte in Betracht ziehen. Eine Erniedrigung der Potentialdifferenz in anderen Teilen der Leitbahnen, wie sie nach den gemessenen p_H-Werten nicht unwahrscheinlich ist, müßte dann zu einem Wasseraustritt aus den Siebröhren führen, auch wenn er nicht durch osmotische Kräfte bewirkt werden könnte. Diese Zusammenhänge bedürfen noch der eingehenden Prüfung, doch muß die Alkalität des Siebröhrensaftes zweifellos bei der Beurteilung des Ferntransportes mehr als bisher gewertet werden.

Der Transport von Saccharose in den Leitbahnen, der, wie mehrfach erwähnt, den Regelfall darstellt, ist für die Pflanze energetisch vorteilhafter als der freier Hexosen: Die Disaccharidbindung hat wie die Esterbindung in den Zuckerphosphaten einen gewissen Energiegehalt und hebt den Zucker erst auf das energetische Niveau, auf dem sich die Stoffwechselumsetzungen abspielen können. Die freien Hexosen sind energiearm und physiologisch inaktiv und müssen vor Eintritt in den Stoffwechsel erst durch die Knüpfung einer Esterbindung aktiviert werden, d. h. eine Energiezufuhr erfahren. Diese erfolgt gewöhnlich aus dem allgemeinen Energiespeicher der Zelle, dem Adenosintriphosphat (ATP). Da nun aus der Photosynthese, dem energetisch ergiebigsten Prozeß der höheren Pflanze, die Kohlenhydrate bereits in energiereicherer Form hervorgehen (Zuckerphosphate, Saccharose), wäre es für die Pflanze unökonomisch, diese Bindungsenergien durch eine Spaltung der Assimilate vor Eintritt in die Leitbahnen in Form von Wärme nutzlos in Freiheit zu setzen, um dann an den Entnahmestellen die Hexosen durch erneute Energiezufuhr stoffwechselaktiv zu machen; es müßte dabei für die Knüpfung einer Esterbindung (Energieinhalt etwa 2 kcal) die Spaltungsenergie der ATP (8,9 kcal nach BERTON 1954) aufgewendet werden.

Von großem Interesse wäre die Feststellung, ob es bei phylogenetisch älteren Typen (etwa den Gymnospermen) einen Transport freier Monosen

gibt; es wäre dies dann zweifellos als primitives Merkmal zu betrachten. Da sich — soweit bekannt — bei keiner dieser Pflanzen in der von uns geübten Weise der Inhalt der Leitbahnen gewinnen läßt, könnten vielleicht phloëmsaugende Insekten dazu herangezogen werden; entsprechende Versuche sind in Vorbereitung. Denkbar ist aber noch eine Weiterentwicklung in der Transportform der Kohlenhydrate: Andere Di-, Tri- und Oligosaccharide würden energetisch ebenfalls vorteilhaft sein. Bemerkenswerterweise scheint dieser Fall bei den Eschen, die auch anatomisch die abgeleitetsten Siebröhren haben ((HUBER 1953, verwirklicht zu sein[1].

Unser Befund, daß die molare Konzentration des Phosphats in den Siebröhren nur einen Bruchteil der Molarität der Saccharose ausmacht, läßt sich entweder durch die Annahme erklären, daß nur ein Bruchteil der Kohlenhydrate als Phosphorsäureester in die Geleitzellen gelangt und hier durch die aktive Phosphatase gespalten wird, oder aber — wahrscheinlicher — durch den Umstand, daß das bei der Spaltung der Phosphorverbindungen freiwerdende Phosphat nur zum geringen Teil in die Siebröhren übertritt, in der Hauptsache aber wieder zu neuen Umsetzungen innerhalb der Geleitzellen herangezogen wird.

Immerhin weist der Siebröhrensaft von allen untersuchten Pflanzensäften die höchste Konzentration des gelösten anorganischen Phosphats auf, eine Konzentration, die wenigstens zeitweise auch über derjenigen der Blattpreßsäfte liegt. Diese Phosphatanreicherung fügt sich zwanglos in die Vorstellung von der Spaltung herangeführter (oder in den Geleitzellen gebildeter) Zuckerphosphate in den Geleitzellen ein.

Auch diese relativ hohe Konzentration des gelösten Phosphats im Siebröhrensaft läßt sich in Beziehung bringen zu der Tatsache, daß das Calcium-Ion im Gegensatz zu den meisten anderen anorganischen Ionen im Phloëm nicht transportiert wird (vgl. oben). (Diese Sonderstellung des Calciums hat sich besonders eindrucksvoll in den Versuchen von WIERSUM 1951 mit der Erdnuß (*Arachis hypogaea* L.) gezeigt, die bei der Fruchtentwicklung im Boden durch das Phloëm des Gynophors ernährt wird, das Calcium aber aus dem Boden aufnehmen muß.) Höhere Calciumkonzentrationen in den Leitbahnen würden zweifellos nicht nur die Phosphorylierungsreaktionen in den „Schaltstationen" des Kohlenhydrattransportes spezifisch hemmen, sondern auch eine weitgehende Fällung des freien, wanderfähigen (und die Zuckerwanderung in den Siebröhren beeinflussenden?) Phosphats zur Folge haben.

[1] ZIMMERMANN fand bei der papierchromatographischen Analyse des Siebröhrensaftes von *Fraxinus americana* hohe Anteile von Stachyose und anderen Oligosacchariden, wie er in einem Brief an Herrn Professor B. HUBER (vom 26. 8. 55) mitteilte. Da die Arbeiten von ZIMMERMANN in vollem Gang und noch unpubliziert sind, wurde von einer qualitativen Prüfung der von uns in anderem Zusammenhang analysierten Eschensäfte abgesehen.

Prinzipiell anders liegen die Verhältnisse in den Bahnen des Transpirationsstroms, wo zumeist das Calcium im Überschuß ist und konzentrationsbegrenzend für das gelöste Phosphat werden kann: Für den Ausgleich von Konzentrationsschwankungen scheinen nach unseren Befunden die Gefäßmembranen eine wichtige Rolle zu spielen.

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen über die Konzentrationsänderungen der einzelnen Komponenten in den Siebröhren während des Tages und während der Vegetationsperiode ist als wesentlich festzuhalten, daß sich die Kohlenhydrate und Aminosäuren zwar in ihrem Tagesgang ähnlich verhalten, indem beide Stoffgruppen — relativ geringfügige — Schwankungen im Zusammenhang mit der Intensität der bereitstellenden Prozesse im Blatt (Assimilation, Eiweißhydrolyse) zeigen, daß die Konzentration der Saccharose in den Leitbahnen im Gegensatz zu der der Aminosäuren aber während der gesamten Vegetationsperiode im großen weitgehend konstant bleibt, worauf auch WANNER (1953a) hinweist. Die Zuckersekretion verläuft demnach immer in etwa derselben, für die verschiedenen Arten oder Rassen charakteristischen Intensität, während das Ausmaß der Aminosäurenabscheidung weit variabler ist.

Die Geschwindigkeit des Transportes der Kohlenhydrate und der organischen Stickstoffverbindungen lag in unseren Versuchen in derselben Größenordnung (um 3 cm/min), die mit der von zahlreichen anderen Autoren übereinstimmt, doch ist die Bestimmung viel zu grob, um weiterreichende Schlüsse zu rechtfertigen. Zweifellos ist aber gerade eine Feststellung des Miteinander- oder Getrenntwanderns verschiedener Stoffgruppen in *ein und derselben* Siebröhre die erfolgversprechendste Methode zur Bestätigung oder Ablehnung einer Massenströmung in den Leitbahnen.

Es mag hier gestattet sein, mit einigen Worten auf die vieldiskutierte Frage der Mechanik der Assimilatwanderung in den Siebröhren einzugehen. Wird eine aktive Beteiligung der Siebröhren selbst am Transport gefordert, wozu man vor allen Dingen infolge der neuerdings elektronenmikroskopisch auch bei den großsporigen Siebplatten des Kürbis festgestellten plasmatischen Füllung der Siebporen (HEPTON, PRESTON u. RIPLEY 1955) veranlaßt wird, so darf nicht übersehen werden, daß die reifen Siebröhren keinen eigenen Atmungsstoffwechsel besitzen, wie WANNER (1953b) gezeigt hat; sie sind energie-heterotroph und daher nicht in der Lage, eine aktivierte Diffusion aus eigener Kraft energetisch zu bestreiten. Man müßte annehmen, daß die Energie, die zur Aufrechterhaltung der spezifischen Struktur der entsprechenden „carrier" oder ähnlicher Leistungen der Siebröhren notwendig ist, von den Geleitzellen, etwa in Form von ATP, den Siebröhren zugeführt wird. Die stoffwechselphysiologisch hochaktiven Geleitzellen (s. o.) wurden ja auch

bereits vielfach als Steuerungszentren der kernlosen Siebröhren betrachtet (vgl. RESCH 1954). Immerhin dürfte diese Anschauung doch erheblichen Schwierigkeiten begegnen, und wir halten deshalb die Ansicht von ARISZ (l. c.), wonach der Transportmechanismus in den Siebröhren verschiedenen Gesetzen folgen kann und etwa bei den Siebzellen der Gymnospermen und primitiven Angiospermen, sowie allgemein in jungen Siebröhren durch eine aktivierte Diffusion, bei den leistungsfähigen, reifen Siebröhren, etwa der Palmen (vgl. TAMMES 1933, 1951) und der meisten Bäume (vor allem der Eschen![1]), durch eine Massenströmung bestritten wird, für sehr beachtenswert.

Daß der „Motor" des Transportes bei der Strömung in den Blättern liegt (vgl. BAUER 1953), wird durch den Befund gestützt, daß der Saftfluß aus dem angeschnittenen Phloëm der Eschen nach dem Laubfall schlagartig aussetzt.

Der Befund, daß andere in den gezapften Säften nachweisbare Stoffgruppen (Gerbstoffe, Farbstoffe u. ä.) wohl zum größten Teil, wenn nicht ausschließlich, erst beim Durchtreten des Siebröhrensaftes durch die angeschnittene Rinde in den Zapfsaft gelangen, bestärkt weiter die Vorstellung, daß spezifische Transportstoffe in den Siebröhren weit überwiegen; besonders augenfällig wird dies auch durch die Tatsache, daß sich der Siebröhrensaft nicht als Nährlösung für die Wurzeln derselben Pflanze eignet.

Die Entnahme der Saccharose aus den Leitbahnen an den Orten des Bedarfs dürfte nach den allgemeinen Vorstellungen von der Zuckeraufnahme der Zellen (vgl. STREET u. LOWE 1950 u. a.) wieder eine aktive Leistung der Geleitzellen darstellen. Ohne Zweifel wird auch hier keine Spaltung des Disaccharids in freie Hexosen eintreten, sondern der Rohrzucker entweder unmittelbar oder nach Überführung in Hexosephosphate in den Stoffwechsel der Empfängergewebe eintreten.

Wie zur Klärung des Ein- und Austrittes der Wanderstoffe in den Siebröhren die eingehendere Kenntnis der Physiologie der Geleitzellen und für ein Verständnis des Wandermechanismus in den Siebröhren die Aufdeckung der Rolle der Siebplatten von entscheidender Be-

[1] Es ist darauf hinzuweisen, daß die Eschen nicht nur anatomisch und in der Zusammensetzung des Siebröhrensaftes eine Sonderstellung einnehmen (s. o.), sondern auch in der Art des Saftflusses beim Anschneiden des Phloëms: Während es sich bei den meisten Bäumen (auch bei *Robinia*) um eine druckelastische Entleerung der geöffneten Leitbahnen handelt, laufen die Siebröhren der Eschen stundenlang aus. Offenbar kommt es hier nicht zu einem Verkleben der (weiten!) Siebporen durch das angehäufte Plasma. Auf dieser Eigenschaft beruht ja auch die Technik der Gewinnung des Eschenmannas (vgl. HUBER 1953).

Länger dauernden Saftfluß zeigt noch der Spitzahorn, wie bereits HARTIG (l. c.) festgestellt hat; hier sind es aber nicht die Siebröhren, die langsam auslaufen, sondern Milchröhren, wie sich leicht aus dem Auftreten der für den Milchsaft charakteristischen, im UV hellgrün fluoreszierenden Triterpene in den späteren Fraktionen feststellen läßt.

deutung sein werden, so ist für eine genauere Vorstellung von der radialen Verteilung der aus den Leitbahnen entnommenen Substanzen eine physiologische Bearbeitung des Stofftransportes in den Markstrahlen Voraussetzung; auch hier übertrifft ja die Geschwindigkeit der Wanderung die einer einfachen Diffusion bei weitem (MASON u. MASKELL 1928). Die Physiologie der Markstrahlen ist aber bis heute eines der am meisten vernachlässigten Gebiete der Pflanzenphysiologie.

Während der Symplast im allgemeinen „dicht" ist und z. B. auch während des Höhepunktes der Assimilatverfrachtung in den Bäumen, im Herbst, keine Kohlenhydrate in die toten Bahnen des Transpirationsstromes übertreten, werden während der Zeit des frühjahrlichen Austreibens organische Substanzen bekanntlich in großer Menge von den Speichergeweben des Stammes und der Wurzel durch den Transpirationsstrom den sich entfaltenden Organen zugeleitet. Die Abscheidung erfolgt offenbar aktiv und es geht ihr wenigstens teilweise ein Umbau der bei der Mobilisierung der Speicherstoffe anfallenden Substanzen voraus. In den phosphataseaktiven Holzparenchymzellen des Spitzahorns konnte erstmals eine spezielle fermentative Ausstattung bestimmter Zellen erkannt werden, die mit diesen Umsetzungen in Zusammenhang gebracht werden kann. Inwieweit es sich bei diesen Elementen um die mit den Gefäßen in besonders innigem Zusammenhang stehenden „Begleitzellen" RESCHs (1955) handelt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Da sich auch für die Blutungssäfte kein Zucker-Phosphat-Konzentrationsverhältnis feststellen ließ, das den bei einer Spaltung von Zuckerphosphaten und einer gleichmäßigen Abscheidung der Spaltprodukte in die Gefäße anfallenden Mengen entspricht, gelten für die Umsetzungen und den Übertritt der Komponenten die gleichen Überlegungen, wie wir sie bei den Siebröhren angestellt haben.

Es scheint zunächst überraschend, daß sich im Blutungssaft der Bäume (mit Ausnahme der Ahorne) vorwiegend freie Hexosen finden, obwohl dies nach unseren obigen Ausführungen energetisch unökonomisch ist. Man könnte daran denken, daß hier die Entwicklung noch nicht allgemein so weit fortgeschritten ist und sich die vorteilhafteste Wanderform allein durchgesetzt hätte (die Ahorne wären dann die fortschrittlichsten Vertreter der „Bluter"). Auch eine andere Vorstellung ist in Erwägung zu ziehen: Da es sich bei den Empfängergeweben des Blutungssaftmaterials durchweg um stoffwechselaktive Meristeme handelt, denen die Phosphorylierung freier Monosen und damit ihre Einbeziehung in den Stoffwechsel wenig Schwierigkeiten bereitet, können sie praktisch konkurrenzlos in den Genuß der herangeführten Zucker kommen, womit das Vorhandensein freier Hexosen im Blutungssaft sogar vorteilhaft für die Pflanze wäre.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

1. Bei allen untersuchten Bäumen (*Alnus glutinosa*, *A. incana*, *Acer platanoides*, *Castanea sativa*, *Fagus sylvatica*, *Populus nigra*, *Quercus borealis*, *Qu. robur*, *Qu. petraea*, *Tilia platyphyllos* und *Robinia pseudoacacia*) ist die Saccharose das einzige Kohlenhydrat in den Siebröhren.

2. Während der Eiweißstickstoff in den Siebröhren weder einen Längsgradienten noch Schwankungen während des Tages und während der Vegetationsperiode zeigt und daher wohl dem Siebröhrenplasma zuzuschreiben ist, lassen die löslichen organischen Stickstoffverbindungen wie die Zucker meist einen charakteristischen Längsgradienten und einen Tagesgang der Konzentration in den Siebröhren erkennen, der sich mit dem des bereitstellenden Prozesses in Verbindung bringen läßt. Die Menge dieser Substanzen nimmt zur Zeit der Eiweißmobilisierung während der Laubvergilbung sehr stark zu, wobei sich auch die Zahl der in größeren Mengen nachweisbaren Aminosäuren erhöht; während bei den untersuchten Eichen (s. o.) und beim Spitzahorn im Sommer nur Glutaminsäure und Asparaginsäure (und wenig Alanin) nachweisbar sind, finden sich im Herbst alle im Blatt nachweisbaren Aminosäuren auch in den Siebröhren. Bei *Robinia* treten während der gesamten Vegetationsperiode dieselben Aminosäuren im Siebröhrensaft auf, doch verschiebt sich der Anteil der einzelnen Verbindungen während der Eiweißmobilisierung wesentlich, wobei vor allem Prolin sehr stark hervortritt.

3. Die Menge des anorganischen Phosphats in den Siebröhren steht in keinem molaren Verhältnis zu der Zuckerkonzentration, zeigt keinen eindeutigen Längsgradienten und läßt sich auch in ihrem Tagesgang nicht in Beziehung setzen zu den Konzentrationsschwankungen des Zuckers. Im Herbst, während der Rückführung des Blattphosphors, nimmt die Konzentration in den Siebröhren stark zu. 7 min-Phosphat fehlt in den Siebröhren; die Menge des schwerhydrolysierbaren Phosphats ist wie die des Proteinstickstoffes in verschiedenen Höhen und zu verschiedenen Zeiten weitgehend konstant und ist den entsprechenden Verbindungen des Siebröhrenplasmas zuzuschreiben.

4. Die Siebröhrensäfte reagieren stets alkalisch (gemessene p_H-Werte zwischen 7,45 und 8,66); diese Reaktion ist nicht unmittelbar verantwortlich für das Fehlen der Invertaseaktivität des Siebröhrensaftes, da sich diese auch bei einer Pufferung auf das p_H-Optimum des Fermentes nicht einstellt.

5. Bei dem auffallenden braunroten Niederschlag, der sich in den Eichenzapfsäften bildet, handelt es sich um Phlobaphene; ihre Vorstufen werden — wie fluorescierende Farbstoffe bei anderen Bäumen — wahrscheinlich erst beim Durchtritt des Siebröhrensaftes aus der Rinde ausgewaschen.

6. Der Borgehalt der Siebröhrensäfte liegt unter 5 γ/ml. Ein Transport von Zucker-Borverbindungen in nennenswertem Umfang ist deshalb ausgeschlossen.

7. Die Viscosität des Siebröhrensaftes wird praktisch ausschließlich durch die Konzentration der alle anderen Komponenten überwiegenden Saccharose bestimmt und läßt sich durch deren Ermittlung leicht festlegen.

8. Der Siebröhrensaft von *Robinia* eignet sich nicht als Nährboden für die Kultur isolierter Robinienwurzeln.

9. Ein Vergleich der Kohlenhydrate, Aminosäuren und Phosphorverbindungen der Siebröhren- und Blattpreßsäfte zeigt, daß alle Stoffgruppen vor ihrem Eintritt in die Leitbahnen $\pm$ umgebaut und — zumindest zeitweise — in diesen angereichert werden.

10. Bei der Honigtaubildung wird der Gehalt des Siebröhrensaftes an organischen Stickstoffverbindungen sehr stark vermindert; in dem untersuchten Fall reicherte eine Coccide diese Substanzen bei der Resorption auf über 100fache Konzentration an.

11. Bei der Nektarsekretion werden die organischen Stickstoffverbindungen fast quantitativ, das Phosphat weitgehend zurückgehalten; diese Filtrierfähigkeit des Drüsengewebes vermindert sich bei der Alterung des Plasmas.

12. In den Bahnen des Transpirationsstromes ist die Konzentration des gelösten anorganischen Phosphats weit niedriger als in den Siebröhren und läßt keinen gesetzmäßigen Längsgradienten erkennen. Die Menge des löslichen Phosphats wird in den meisten Fällen durch den Überschuß der Calcium-Ionen im Gefäßwasser begrenzt; für einen Ausgleich von Konzentrationsschwankungen im Transpirationsstrom spielen die an den Gefäßmembranen adsorbierten Ionen eine wesentliche Rolle.

13. Auch in den Frühjahrsblutungssäften der Bäume steht die Konzentration des anorganischen Phosphats in keinem molaren Verhältnis zu der Menge der Kohlenhydrate. Unter den Zuckern überwiegen normalerweise die Hexosen, bei den Ahornen dagegen die Saccharose.

14. Galaktose erscheint bei der Fütterung der Rinde unverändert in den Siebröhren; es kann sich bei der Saccharosesynthese in den Phloëmscheiden demnach nicht um eine unspezifische Transglucosylierung handeln. Glucose und Fructose werden offenbar in größerem Umfang in die Wandersaccharose eingebaut, doch treten sie ebenfalls schon bei relativ geringem Angebot als freie Monosen in den Leitbahnen auf.

15. Die Dephosphorylierung der bei der Mobilisierung der Reservestoffe im Holz während des Frühjahrs wenigstens zum Teil anfallenden

Zuckerphosphate erfolgt beim Ahorn in bestimmten phosphataseaktiven Holzparenchymzellen, die in den leitenden Jahrringen des Stammes zu einem ± regelmäßigen Muster angeordnet sind.

16. Auch im Nektarium von *Abutilon striatum* konnte eine hohe Aktivität der sauren Phosphatase nachgewiesen werden.

17. Der Sauerstoffverbrauch des Nektargewebes liegt stets über dem der Nachbargewebe; die höchste Steigerung erfährt er während der Sekretionsphase. 2,4-Dinitrophenol fördert in geringer und hemmt in höherer Konzentration, Kaliumfluorid hemmt stets die Nektarsekretion; dabei werden Zucker- und Wasserabscheidung in gleicher Weise beeinflußt.

18. Fremdzucker, wie Galaktose und Arabinose, die im Nektar unverändert abgeschieden werden, steigern den Sauerstoffverbrauch der Nektarien in ungleich geringerem Ausmaß als Glucose und Fructose, die in den Stoffwechsel der Nektarien mit einbezogen werden können.

19. Besonderheiten des Calciumhaushaltes, wie die häufige Ausfällung des Ions als Calciumoxalat in der Umgebung des Phloëms und der Nektarien, sowie das Fehlen eines Calciumtransportes in den Siebröhren lassen sich in Beziehung setzen zu der spezifischen Hemmwirkung des Ions für die Fermentreaktionen des Phosphorsäureumsatzes.

20. Die Folgerungen der Ergebnisse für das Verständnis des Assimilattransportes, vor allem im Zusammenhang mit der Drüsenfunktion der Geleitzellen, werden diskutiert.

Literatur

Agthe, C.: Über die physiologische Herkunft des Pflanzennektars. Ber. schweiz. bot. Ges. **61**, 240—273 (1951). — Anderssen, F. G.: Some seasonal changes in the tracheal sap of pear and apricot trees. Plant Physiol. **4**, 459—476 (1929). — Arens, K.: Die Tag-Nacht-Differenz des Kalziumgehaltes von Laubblättern. Jb. wiss. Bot. **88**, 169—176 (1939). — Arisz, W. H.: Transport of organic compounds. Annual Rev. Plant Physiol. **3**, 109—130 (1952). — Arisz, W. H., J. Camphuis, H. Heikens u. A. J. van Tooren: The secretion of the salt glands of Limonium latifolium Ktze. Acta bot. néerl. **4**, 322—338 (1955). — Arnhardt, L.: Die Entstehung des Honigtaues. Arch. Bienenkde **7**, 245—256 (1926). — Bauer, L.: Zur Frage der Stoffbewegungen in den Pflanzen mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. Planta (Berl.) **42**, 367—451 (1953). — Berton, K.: The free energy change associated with the hydrolysis of the thiol ester bound of acetyl coenzym A. Biochemic. J. **59**, 44—46 (1954). — Beutler, R.: Biologisch-chemische Untersuchungen am Nektar von Immenblumen. Z. vergl. Physiol. **12**, 72—176 (1930). — Bois, E., and A. Nadeau: Canad. J. Res., Sect. B **16**, 114, 121 (1938). [Zit. nach H. G. Albaum, The metabolism of phosphorylated compounds in plants. Annual Rev. Plant Physiol. **3**, 35—58 (1951)]. — Brüggemann, J., u. K. Drepper: Neue Methoden zur Entwicklung von Chromatogrammen. Naturwiss. **39**, 301 (1952). — Buchberger, W.: Aneurin im auf- und absteigenden Pflanzensaft. Phyton (Horn, N.-Ö.) **4**, 101—104 (1952). — Büsgen, M.: Der Honigtau. Jena 1891. — Calvin, M., and A. Benson: The path of carbon in photosynthesis. IV. The identity and sequence

of the intermediate in the sucrose synthesis. Science (Lancaster, Pa.) **109**, 140—142 (1949). — COHN, M.: Mechanism of cleavage of glucose-1-phosphate. J. of biol. Chem. **180**, 771—781 (1949). — COLLANDER, R., u. A. HOLMSTRÖM: Die Aufnahme von Sulfosäurefarbstoffen seitens pflanzlicher Zellen — ein Beispiel der adenoiden Tätigkeit des Protoplasten. Acta Soc. Fauna et Flora fenn. **60**, 129—135 (1937). — COOIL, B. J.: Significance of phloem exudate of Cucurbita pepo with reference to translocation of organic materials. Plant Physiol. **16**, 61—84 (1941). — CRAFTS, A. S., and O. A. LORENZ: Fruit growth and food transport in Cucurbits. Plant Physiol. **5**, 329—344 (1944). — CURRIER, H. B., K. ESAU and V. I. CHEADLE: Plasmolytic studies of phloem. Amer. J. Bot. **42**, 68—81 (1955). — CURTIS, O. F.: The Translocation of Solutes in Plants. New York u. London 1935. — CURTIS, O. F., and G. N. ASAI: Evidence relative to the supposed permeability of sieve tube protoplasm. Amer. J. Bot. **26**, 16s—17s (1939), Abstract. — D'ANS, J., u. E. LAX: Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1949. — ENGARD, C. H.: Translocation of carbohydrates in the Cuthbert raspberry. Bot. Gaz. **100**, 439—464 (1939). — EWERT, R.: Das Honigen unserer Obstgewächse. Leipzig 1940. — FIFE, J. M., and V. L. FRAMPTON: The p_H gradiente extending from the phloem into the parenchyma of the sugar beet and its relation to the feeding behaviour of Eutettix tenellus. J. Agrar. Res. **53**, 581—593 (1936). — FREI, E.: Die Phloemversorgung der floralen Nektarien. Diplomarbeit ETH Zürich 1952. — FREY, G.: Aktivität und Lokalisation von saurer Phosphatase in den vegetativen Teilen einiger Angiospermen und in einigen Samen. Ber. schweiz. bot. Ges. **64**, 390—452 (1954). — FREY-WYSSLING, A., u. C. AGTHE: Nektar ist ausgeschiedener Phloëmsaft. Verh. schweiz. naturforsch. Ges. **1950**, 175—176. — FREY-WYSSLING, A., M. ZIMMERMANN u. A. MAURIZIO: Über den enzymatischen Zuckerumbau in Nektarien. Experientia (Basel) **10**, 490—491 (1954). — FRIES, N.: Variations in the content of phosphorus, nucleic acids and adenine in the leaves of some decidous trees during the autumn. Plant a. Soil (The Hague) **4**, 29—42 (1952). — GAUCH, H. G., and W. M. DUGGER: The role of boron in the translocation of sucrose. Plant Physiol. **28**, 457—466 (1953). — GEINITZ, B.: Die Entstehung des Tannenhonigs. Arch. Bienenkde **11**, 308—318 (1930). — GLICK, D.: Techniques of Histo- and Cytochemistry. New York u. London 1949. — HANES, C. S.: The reversible formation of starch from glucose-1-phosphate catalysed by potato phosphorylase. Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B **129**, 174—208 (1940). — HARTIG, TH.: Beiträge zur physiologischen Forstbotanik. Allg. Forst- u. Jagdztg **36**, 257—261 (1860). — HASSID, W. Z., M. DOUDOROFF and H. A. BARKER: Enzymatically synthetisized crystalline sucrose. J. Amer. chem. Soc. **66**, 1416—1419 (1944). — HEHRE, E. J.: Enzymic synthesis of polysaccharids: a biological type of polymerization. Adv. Enzymol. **11**, 297—337 (1951). — HEPTON, C. E. L., R. D. PRESTON and G. W. RIPLEY: Electron microscopic observations on the structure of the sieve plates in Cucurbita. Nature (Lond.) **176**, 868—870 (1955). — HEYL, J. G.: Der Einfluß von Außenfaktoren auf das Bluten der Pflanzen. Planta (Berl.) **20**, 294—353 (1933). — HUBER, B.: Die Siebröhren der Pflanzen als Nahrungsquellen fremder Organismen und als Transportbahn von Krankheitskeimen. Biol. generalis (Wien) **16**, 310—343 (1942). HUBER, B.: Wasserumsatz und Stoffbewegungen. Fortschr. Bot. **11**, 146—166 (1944). — HUBER, B.: Registrierung des CO_2-Gefälles und Berechnung des CO_2-Stromes über Pflanzengesellschaften mittels Ultrarot-Absorptionsschreibers. Ber. dtsch. bot. Ges. **63**, 53—64 (**1950**). — Die Gewinnung des Eschenmanna — eine Nutzung von Siebröhrensaft. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 340—346 (1953). — HUBER, B., E. SCHMIDT u. H. JAHNEL: Untersuchungen über den Assimilatstrom. I. Tharandt. Forstl. Jb. **88**, 1017—1050 (1937). — HUMPHRIES, E. E.: Wilt of cacao fruits (Theobroma cacao). IV. Seasonal variation in the carbohydrate reserves

of the bark and wood of the Cacao tree. Ann. of Bot., N. S. **11**, 219—244 (1947). — JOHNSON, F. R., and J. H. KUGLER: The distribution of the alkaline phosphatase in the mucosal cells of the rat, cat and dog. J. of Anat. **87**, 247—256 (1953). — KOCH, W.: Eine Methode zur Vermeidung des „Kuvettenklimas" bei Gaswechselregistrierungen. Naturwiss. **43**, 64 (1956). — KÜHN, R.: Morphologische und zytochemische Untersuchungen an floralen Nektarien von Bienenpflanzen. Festschr. z. 25jähr. Bestehen des gärtnerischen Hochschulstudiums in Deutschland, S. 163 bis 179. Berlin-Hamburg 1954. — KURSANOV, A. L.: Die Bewegung organischer Substanzen in der Pflanze. Bot. Ž. **37**, 585—593 (1952). — Synthese und Speicherung der Saccharose in der Zuckerrübe. Bot. Ž. **39**, 482 (1954). — KURSANOV, A. L., i M. W. TURKINA: Die Atmung der Leitbündel. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **84**, 1073 (1952a). — Die Atmung der Leitgewebe und der Transport der Saccharose. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **85**, 649—652 (1952b). — Zur Frage der Wanderform der Zucker im Leitungsgewebe der Zuckerrübe. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **95**, 885—888 (1954). — KURSANOV, A. L., M. W. TURKINA i I. M. DUBININA: Die Anwendung der Isotopenmethode auf das Studium der Zuckerwanderung in der Pflanze. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **93**, 1115 (1953). — LELOIR, L. F., and C. E. CARDINI: The biosynthesis of sucrose. J. Amer. chem. Soc. **75**, 6084 (1953). — LEONHARDT, H.: Klima, Witterung und Honigtau. Anz. Schädlingskde **16**, 85—90 (1940). — LÖHR, E.: Die Zuckerarten im Blutungssaft von Betula und Carpinus. Physiol. Plantarum (Copenh.) **6**, 529—532 (1953). — LUNDEGÅRDH, H.: The transport of water in wood. Ark. Bot. (Stockh.), Andra Ser. **3**, 89—119 (1955). — MARTLAND, M., and R. ROBISON: Possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. IV. Phosphoric esters in blood plasma. Biochemic. J. **20**, 847—855 (1926). — MASON, T. G., and E. J. MASKELL: Studies on the transport of carbohydrates in the cotton plant. I. A. study of diurnal variation in the carbohydrates of leaf, bark, and wood and the effect of ringing. Amer. J. Bot. **42**, 189—253 (1928). — MCELROY, W. D., and A. NASON: Mechanism of action of micronutrient elements in enzyme systems. Annual Rev. Plant. Physiol. **5**, 1—30 (1954). — MICHEL, E.: Beiträge zur Kenntnis von Lachnus (Pterochlorus) roboris L., einer wichtigen Honigtauerzeugerin der Eiche. Z. angew. Entomol. **29**, 244—266 (1942). MOOSE, C. A.: Chemical and spectroscopic analysis of phloem exsudate and parenchyma sap from several species of plants. Plant Physiol. **13**, 365—380 (1938). — MOTHES, K., u. C. ENGELBRECHT: Über Allantoinsäure und Allantoin. I. Ihre Rolle als Wanderform des Stickstoffs und ihre Beziehungen zum Eiweißstoffwechsel des Ahorns. Flora (Jena) **139**, 568—616 (1952). — MÜNCH, E.: Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Jena 1930. — NELSON, J. M., and G. BLOOMFIELD: Some characteristics of invertase action. J. Amer. chem. Soc. **46**, 1025—1043 (1924). — NOLD, R. H.: Die Funktion der Blase von Utricularia vulgaris. (Ein Beitrag zur Elektrophysiologie der Drüsenfunktion.) Beih. bot. Cbl., Abt. A **52**, 415—448 (1934). — NUORTEVA, P.: Die Nahrungspflanzenwahl der Insekten im Lichte von Untersuchungen an Zikaden. Ann. Acad. Sci. fenn., Ser. A, IV. **1952**. — PAECH, K., u. M. V. TRACEY: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 2. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955. — PANKRATOVA, N. M.: Eine Untersuchung der Nektarausscheidung. Z. obšč. Biol. **11**, 292—305 (1950). — PETRITSCHEK, K.: Über die Beziehungen zwischen Geschwindigkeit und Elektrolytgehalt des aufsteigenden Saftstromes. Flora (Jena) **140**, 345—385 (1953). — PFEIFFER, M.: Die Verteilung der osmotischen Werte im Baum im Hinblick auf die MÜNCHsche Druckstromtheorie. Flora (Jena) **132**, 1—47 (1937). — PFEFFER, W.: Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. 1. Leipzig 1897. — PHILLIS, E., and T. G. MASON: Studies on the transport of carbohydrates in the cotton plant. III. The polar distribution of sugar in the foliage leaf. Ann. of Bot. **47**, 585—634 (1933). — RAWITSCHER, F.: Wohin stechen die Pflanzenläuse? Z. Bot. **26**, 145—168 (1933). — RESCH, A.: Beiträge

zur Cytologie des Phloems. Planta (Berl.) **44**, 75—98 (1954). — Beiträge zur Cytologie des Xylems. Planta (Berl.) **45**, 307—324 (1955). — Reuter, G., u. H. Wolffgang: Vergleichende Untersuchungen über den Charakter der Stickstoffverbindungen von Baumblutungssäften der Betulaceen und anderer Holzarten. Flora (Jena) **142**, 146—155 (1954). — Röckl, B.: Nachweis eines Konzentrationshubes zwischen Palisadenzellen und Siebröhren. Planta (Berl.) **36**, 530—550 (1949). — Rouschal, E.: Wasserumsatz und Stoffbewegungen. Fortschr. Bot. **9**, 134—159 (1940). — Schumacher, W.: Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot. **77**, 685—732 (1933). — Weitere Untersuchungen über die Wanderung von Farbstoffen in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot. **85**, 422—449 (1937). — Schwerdtfeger, E.: Modifizierte eindimensionale Papierchromatographie für quantitative Zwecke. Naturwiss. **41**, 18 (1954). — Seybold, A., H. Mehner u. H. Bühler: Bestimmung des Phosphor- und Eisengehaltes verschieden gefärbter Laubblätter. Biol. Zbl. **69**, 229—240 (1950). — Street, H. E., u. J. S. Lowe: The carbohydrate nutrition of tomato roots. Ann. of Bot., N. S. **14**, 307—329 (1950). — Szebellédy, L., u. St. Tanay: Beiträge zum Nachweis der Borsäure mit Alizarin. Z. analyt. Chem. **107**, 26—30 (1936). — Tammes, P. M. L.: Observations on the bleeding of palm trees. Rec. Trav. bot. néerl. **30**, 504—536 (1933). — Bleeding of and sieve tube transport in palm trees. Proc. Kon. nederl. Akad. Wetensch. C **54**, 30—31 (1951). — Tolbert, N. E., and L. Pr. Zill: Metabolism of sedoheptulose-C^{14} in plant leaves. Arch. of Biochem. a. Biophysics **50**, 392—398 (1954). — Turkina, M. W.: Über die Synthese und Fortbewegung der Saccharose in der Zuckerrübenpflanze. Biochimija **19**, 357—367 (1954). — Turkina, M. W., i I. M. Dubinina: Einige Besonderheiten des Atmungssystems der Leitbündel. Einige Besonderheiten des Atmungssystems der Leitbündel. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **95**, 199—202 (1954). — Turner, J. F.: Synthesis of sucrose by a plant enzyme extract. Nature (Lond.) **172**, 1149 (1953). — Vernon, L. P., and S. Aronoff: Metabolism of soybean leaves. IV. Translocation from soybean leaves. Arch. of Biochem. a. Biophysics **36**, 383—396 (1952). — Wanner, H.: Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. Planta (Berl.) **41**, 190—194 (1952). — Die Zusammensetzung des Siebröhrensaftes: Kohlenhydrate. Ber. schweiz. bot. Ges. **63**, 162—168 (1953a). — Enzyme der Glykolyse im Phloemsaft. Ber. schweiz. bot. Ges. **63**, 201—212 (1953b). — Wiersum, L. K.: Water transport in the xylem as related to calcium uptake by groundnuts (Arachis hypogaea L.). Plant a. Soil (The Hague) **3**, 160—169 (1951). — Wolffgang, H., u. K. Mothes: Papierchromatographische Untersuchungen an pflanzlichen Blutungssäften. Naturwiss. **40**, 605 (1953). — Yin, H. C.: A histochemical study of the distribution of phosphatase in plant tissue. New Phytologist **44**, 191 (1945). — Ziegler, H.: Lathraea, ein Blutungssaftschmarotzer. Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, 311—318 (1955a). — Phosphataseaktivität und Sauerstoffverbrauch des Nektariums von Abutilon striatum Dicks. Naturwiss. **42**, 259/260 (1955b). — Über die Lokalisierung der sauren Phosphatase im Holz des Spitzahorns (Acer platanoides L.). Naturwiss. **42**, 260 (1955c). — Zimmermann, M.: Papierchromatographische Untersuchungen über die pflanzliche Zuckersekretion. Ber. schweiz. bot. Ges. **63**, 402—429 (1953).

Priv.-Doz. Dr. H. Ziegler, München, Forstbotan. Institut, Amalienstr. 52

Planta, Bd. 47, S. 501—509 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

ZUR KENNTNIS VON EPILOBIUM UND OENOTHERA. 1. ÜBER DIE RHAPHIDENSCHLÄUCHE. 2. ÜBER INTERGENERISCHE TRANSPLANTATION*, **

Von

ROSE KOWALEWICZ

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. März 1956)

1. Die Rhaphidenschläuche

Bei entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen über die Blüten von *Epilobium* und *Oenothera* (KOWALEWICZ 1956) ergab es sich von selbst, daß auch auf die in den Parenchymen aller Organe massenhaft vorkommenden Rhaphiden und ihre Behälter geachtet wurde. Die erste Frage, die sich stellte, war die nach dem Zustandekommen der außerordentlichen Länge der Kristallschläuche, die bei *Epilobium* bis 1 mm, bei *Oenothera* bis 1,4 mm messen (Abb. 1); in der Literatur (z. B. NETOLITZKY 1929, KÜSTER 1951, ESAU 1951; auch viele Originalliteratur wurde eingesehen) findet sich darüber keine Auskunft. Weiter war, nach den vielfältigen Erfahrungen über Endopolyploidie bei großen Dauerzellen (vgl. z. B. GEITLER 1953) das Verhalten der Zellkerne zu verfolgen.

Zur Untersuchung im Leben sind die Blumenblätter am günstigsten, die durch Injektion unter der Luftpumpe sehr durchsichtig werden, weil sie aus wenigen Zellschichten bestehen. Quetschpräparate für Karminfärbung lassen sich am besten aus jungen Staubblättern herstellen. In mit Hämatoxylin gefärbten Mikrotomschnitten waren alle Blütenorgane gut verwendbar.

a) Der fertige Zustand. Die meisten Untersuchungen wurden an *Epilobium hirsutum* ausgeführt. In den reifen Kristallzellen ist der größte Teil des Lumens von Schleim eingenommen. Das kurze Bündel feiner Nadeln liegt, von einer sehr zarten Plasmahaut umhüllt, in der Mitte des langen Schlauches, der Cytoplasmabelag der Wand ist sehr dünn, nur an den Enden des Idioblasten findet sich eine größere Plasmaansammlung. Eine Verbindung des Wandbelags mit der plasmatischen Hülle des Rhaphidenbündels war im Leben nie zu sehen, wohl aber

* Teil einer Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München.

** Der Deutschen Forschungsgemeinschaft habe ich für ein Stipendium zu danken, Herrn Professor O. RENNER für die Leitung der Arbeit, Herrn E. KRAUSE für die Herstellung der Photographien.

zuweilen an gefärbten Dauerpräparaten. Plastiden fehlen. Eine Überraschung war, daß die Schläuche regelmäßig zwei (selten drei) Zellkerne enthalten[1], was bis jetzt von Rhaphidenzellen nicht berichtet wird; auch TISCHLER, der die bekannten Fälle von Mehrkernigkeit verschiedener Zelltypen zusammenstellte (1934, S. 398), weiß nichts davon.

Die zwei Kerne des Rhaphidenschlauches liegen in der Nähe des Nadelbündels (Abb. 1), und zwar entweder unmittelbar nebeneinander oder schräg gegenüber an verschiedenen Seiten, nur ausnahmsweise findet man sie auch weiter vom Bündel entfernt. Sie sind doppelt so groß wie die Kerne der Epidermiszellen, ein Drittel größer als die Kerne des Mesophylls, ebensogroß wie die Kerne der Pollenmutterzellen. Vermehrung der Chromozentren, also Polyploidie durch Endomitose, scheint nicht vorzuliegen. Die Beobachtung anderer Autoren, daß die aufgeblasenen Rhaphidenkerne sich schwächer anfärben als die Kerne ihrer Nachbarzellen, bestätigte sich auch an unserem Material. Die Gestalt der Zellkerne ist im Fertigzustand linsenförmig. Jedoch sind sie nur selten in Aufsicht zu sehen, da sie den Seitenwänden des Schlauches in charakteristischer Weise anliegen. Während bei der Färbung mit Karminessigsäure die Chromozentren deutlicher erkennbar werden, tritt bei der Färbung mit Eisenhämatoxylin der große Nucleolus klar heraus.

Die Rhaphidenzellen der *Oenothera biennis*[2] weichen nur insofern ab, als sie noch länger werden und mehrfach stark gekrümmt sein können. Ihr Kristallnadelbündel ist lockerer, vielfach gleiten die Nadeln auseinander und machen in kleinen Gruppen oder einzeln hintereinanderliegend die Krümmungen des Schlauches mit (Abb. 1a).

„Leere" Rhaphidenschläuche, in denen Kristallnadeln fehlen bzw. nachträglich wieder aufgelöst worden sind, wie für andere Pflanzen mehrfach angegeben, konnten wir weder bei *Epilobium* noch bei *Oenothera* finden.

In den Rhaphidenzellen mehrerer Monokotyledonen und einiger Vitaceen wurde immer ein einziger Kern gefunden, in den ziemlich langen Schläuchen einiger Arten von *Impatiens* selten ein zweiter Kern. Auch bei *Impatiens*, z. B. in den Petala von *I. Oliveri*, ist die Kerngröße abgestuft, nämlich Kristallschläuche > Schwammgewebe > Epidermis.

b) Die Entwicklung. Junge Blütenknospen von *Epilobium hirsutum* sind nur bis zu einer Gesamtlänge (d. h. mit Einschluß des unterständigen Fruchtknotens) von 460 μ noch frei von Rhaphidenzellen. Dann bemerkt man, wie diese in den einzelnen Organkreisen entsprechend deren Anlagefolge auftreten: Bei 620 μ GL sindschon die ersten in den Vorläuferspitzen

[1] Schon mitgeteilt bei RENNER u. Mitarb. 1952, S. 424.

[2] In der bei ESAU als neu zitierten Arbeit von POBEGUIN (1943) ist ein Wurzellängsschnitt von *Oenothera Lamarckiana* dargestellt (Fig. 36), der die Orientierung der Rhaphidenbündel in der Längsrichtung des Organs zeigen soll. Im übrigen ist auch diese Abhandlung für unsere Fragestellungen nicht ergiebig.

der Kelchblätter zu erkennen, bei 1,4 mm GL im ersten, bei 1,7 mm GL im zweiten Staubblattkreis und bei cruciaten Blüten auch in den Spitzen der Kronblätter, während sie in den Kronblättern der normalen Blüten etwa bei 2,6 mm GL erscheinen. Sie eilen mit ihrem Differenzierungsbeginn dem übrigen Gewebe weit voraus. Zum größten Teil werden sie in unmittelbarer Nähe der Vegetationspunkte angelegt. In Gewebeabschnitten, welche sich von den Vegetationspunkten schon entfernt haben, entstehen weit weniger Rhaphiden-Idioblasten und auch nur so lange noch, als in diesen Gebieten Zellteilungen stattfinden. Damit bestätigt sich UNGERS Feststellung (1914) an *Oe. biennis*, daß Zellen, die dem Embryonalstadium einmal entwachsen sind, sich unter keinen Umständen mehr zu Rhaphidenzellen differenzieren (zitiert nach NETOLITZKY). Beachtenswerterweise entstehen die frühen Rhaphiden-Idioblasten bevorzugt in unmittelbarer Nähe des gleichfalls früh entstehenden Procambiumnetzes. Dies ist besonders gut an Kron- und Kelchblättern zu verfolgen. Wenn gegen Ende des Embryonalwachstums die jüngsten Rhaphidenzellen angelegt werden, haben die ältesten schon eine ansehnliche Länge erreicht. Diesen Vorsprung holen die jüngeren nicht mehr ein. Damit gibt sich schon die wichtigste Ursache dafür zu erkennen, daß im Fertigzustand eines Organes Rhaphidenzellen verschiedener Größe nebeneinander vorkommen.

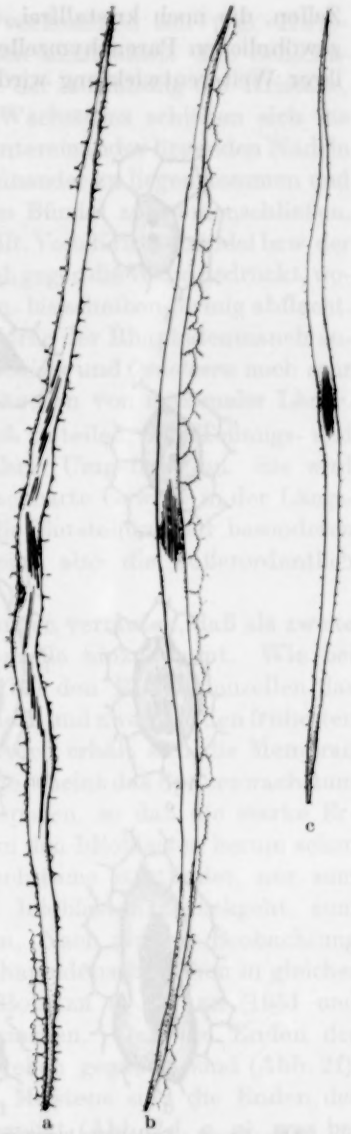

Abb. 1a—c. Ausgewachsene Rhaphidenschläuche. a und b von Oenothera biennis; c von Epilobium hirsutum. 100fach

Die Differenzierung der einzelnen Rhaphidenzelle wird durch eine Kernteilung eingeleitet, der eine Zellteilung nicht mehr folgt (Abb. 2a). Der für den jungen Idioblasten kennzeichnende chemische Zustand hemmt also die Zellteilung und weiterhin die Kernteilung. Zweikernige

Zellen, die noch kristallfrei, aber schon ein wenig größer sind als die gewöhnlichen Parenchymzellen, wurden öfter gefunden (Abb. 2b). Bei ihrer Weiterentwicklung wird die Lage der Schlauchspitzen durch die

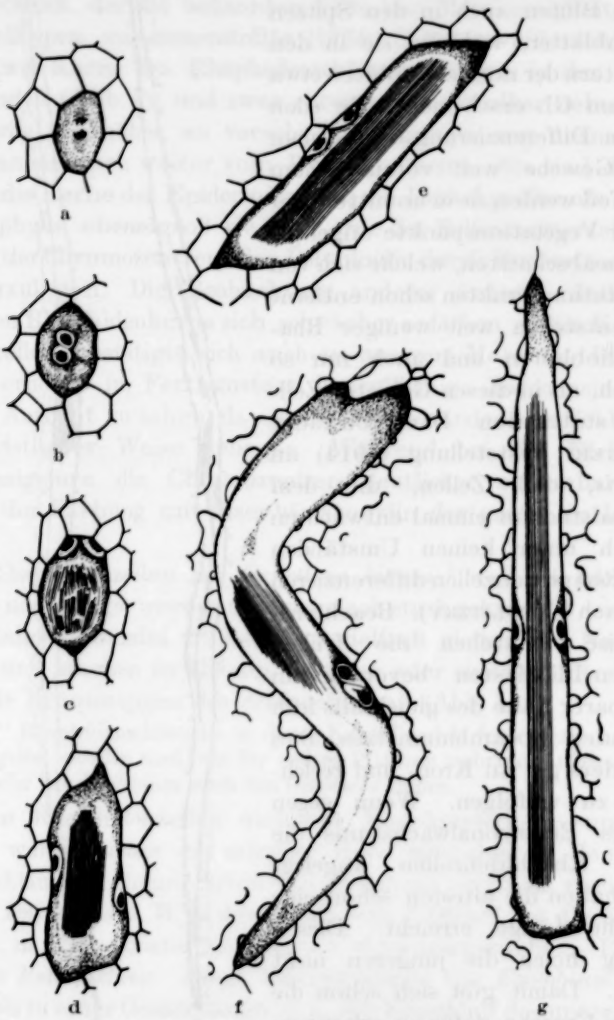

Abb. 2a—g. Epilobium hirsutum, Entwicklung der Rhaphidenzellen. 400fach

Hauptwachstumsrichtung des Organs bestimmt. Sie sind bei unseren Objekten immer so gerichtet, daß die Längsachse des Idioblasten parallel zu ihr verläuft. Bei der Bildung der Kristalle wirkt das Plasma richtunggebend: die Nädelchen werden in feinen von Spitze zu Spitze ziehenden Plasmafäden ausgefällt und liegen deshalb immer sofort parallel zur Längsachse des Behälters (Abb. 2c). Ein nachträgliches

Ordnen, wie es bei gewissen Pflanzen vorkommen soll (vgl. NETOLITZKY S. 64), findet bei unseren Objekten nicht statt. Die Schleimbildung beginnt meistens gleichzeitig mit der Ausfällung der Kristalle, seltener schon vorher. Während ihres Wachstums schieben sich die anfangs meist in zwei und mehr Reihen hintereinander liegenden Nadeln aneinander vorbei, so daß sie dicht nebeneinander zu liegen kommen und allmählich zu einem etwa spindelförmigen Bündel zusammenschließen. Dieses wird bald ganz vom Schleim eingehüllt. Vom Kristallbündel bzw. der Schleimvacuole werden die Kerne schon früh gegen die Wand gedrückt, wobei sich ihre anfangs kugelige Gestalt linsen- bis scheiben-förmig abflacht. Im Gegensatz zu den Mitteilungen über Kerne der Rhaphidenmanch anderer Pflanzen bleiben die Nuclei bei *Epilobium* und *Oenothera* noch sehr lange erhalten. Ich sah sie noch in Schläuchen von maximaler Länge.

Die Rhaphidenzelle paßt sich, ohne sich zu teilen, dem Teilungs- und später auch dem Streckungswachstum ihrer Umgebung an. Sie wird deshalb um so länger, je stärker das benachbarte Gewebe in der Längsrichtung wächst. Als eine Ursache für die Entstehung der besonderen Größe des Rhaphidenschlauches läßt sich also die außerordentlich *frühe Differenzierung* erkennen.

Daneben lassen bestimmte Beobachtungen vermuten, daß als zweite Ursache *Spitzenwachstum* der Rhaphidenzelle hinzukommt. Wie bei Wurzelhaaren finden wir nämlich auch bei den Rhaphidenzellen das Plasma an den Spitzen auffällig angesammelt, und zwar von den frühesten Entwicklungsstadien an (Abb. 2b—d). Auch erhält sich die Membran an den Spitzen besonders zart. Demzufolge scheint das Spitzenwachstum gleich von Anfang an eine Rolle mitzuspielen, so daß die starke Erhöhung der Zellenzahl, die unmittelbar um den Idioblasten herum schon während des allgemeinen Embryonalwachstums stattfindet, nur zum Teil auf die frühe Differenzierung des Idioblasten zurückgeht, zum anderen Teil auf dieses Spitzenwachstum. Nach unserer Beobachtung könnte das Spitzenwachstum bei den Rhaphidenschläuchen in gleicher Weise vor sich gehen, wie es SCHOCH-BODMER u. HUBER (1951 und früher) für Bastfasern wahrscheinlich machen. Daß die Enden der Schläuche, wie bei den Bastfasern, zuweilen gegabelt sind (Abb. 2f), spricht ebenfalls für Spitzenwachstum. Meistens sind die Enden des Schlauches aber einfach keilförmig zugespitzt (Abb. 2d, e, g), was bei dieser Wachstumsweise besonders gut zu verstehen ist.

Ob nach Abschluß des Teilungswachstums noch Spitzenwachstum der Kristallschläuche stattfindet, haben wir durch Auszählung der in den Petala über bzw. neben den Schläuchen liegenden Zellen der Epidermis und des Parenchyms in verschiedenen Entwicklungszuständen zu prüfen versucht. Im Fall von Spitzenwachstum muß die Zahl der Zellen, in deren Bereich die Idioblasten kommen, mit der Zeit zunehmen. Aber bei der ungleichen Länge der zu verschiedener Zeit angelegten Schläuche war kein sicheres Urteil zu gewinnen.

An die reifen Rhaphidenschläuche von *Oe. biennis* grenzen in der Abb. 1a über 40 Zellen des Schwammgewebes, in Abb. 1b 35 Zellen der Epidermis. Bei *Epilob. hirsutum*, Abb. 1c, sind die kleineren anstoßenden Zellen noch zahlreicher, über 50.

Während in der ersten Zeit der Idioblastenentwicklung die Kristallnadeln mit dem Wachstum des Schlauches Schritt halten, so daß sie diesen fast ganz ausfüllen, hört die Vergrößerung der Kristalle nach Beendigung des allgemeinen Embryonalwachstums auf. Der Schlauch verlängert sich aber unabhängig vom Kristallnadelbündel in der beschriebenen Weise weiter, wobei er auch noch stark in die Weite wächst.

Ergebnis. Die Differenzierung der Idioblasten, die zu Kristallbehältern werden sollen, beginnt mit einer Kernteilung, auf die keine Zellteilung folgt. Die beiden Kerne, in denen Endomitose nicht festgestellt wurde, halten sich dauernd in der Mitte der Zelle, in nächster Nähe des Rhaphidenbündels. Die Nadeln sind schon in ihren Anfängen in der Längsrichtung der Zelle ausgerichtet. Ihre große Länge — bis 1 mm und mehr — verdanken die Rhaphidenschläuche in erster Linie ihrer sehr frühen Differenzierung im embryonalen Gewebe, aber auch Spitzenwachstum scheint ein Teil dazu beizutragen.

2. Intergenerische Transplantationsversuche

Gegenüber den Angaben sowjetischer Genetiker wie GLUSTSCHENKO (1950) über „vegetative Hybridisation" schien es angebracht, Transplantation zwischen *Oenothera* und *Epilobium* zu versuchen, weil in beiden Gattungen Idioplasma außerhalb des Zellkernes dem Experiment einigermaßen zugänglich geworden ist. Die Verwachsungen gelangen gut, die Ergebnisse sollen ganz kurz geschildert werden[1].

1. *Oe. biennis*-Rosette, darauf Seitenzweige von *Epilobium hirsutum*, 10mal. Die Reiser neigten zur Bildung von Wurzeln über der Pfropfstelle, entwickelten sich auch nach Entfernung der Wurzeln gut und brachten große schöne Blüten.

2. *Oe. biennis*-Rosette, darauf Seitenzweige von *Epil. montanum*, meist mit schon angelegten Blütenknospen, 10mal. Wurzelbildung am Reis unterblieb, die Reiser wuchsen nicht besonders gut, die Blüten blieben teilweise etwas kleiner als normal.

3. *Oe. biennis*-Stengel, darauf Zweige von *Epil. hirsutum*, 2mal. Über der Schnittfläche bildeten sich Wurzeln, die teils entfernt wurden, teils später nach guter Verwachsung vertrockneten. Die Reiser wuchsen gut, verzweigten sich reich und brachten besonders schöne große Blüten in großer Zahl, auch große samenreiche Früchte. Aus solchen Samen aufgezogene Pflanzen, 40 an der Zahl, zeigten keinerlei Abweichungen von normaler Saat. Nach der Blüte im Herbst entstanden am Grund

[1] Schon kurz mitgeteilt in RENNER u. Mitarb. 1952, S. 424.

der Reiser dicke, leuchtend rot gefärbte, abwärts wachsende, mit Schuppenblättern besetzte Triebe, ganz wie die herbstlichen Ausläufer, wenn sie sich am Licht entwickeln (Abb. 3). Auch die Spitzen der beblätterten Seitentriebe wandelten sich teilweise in positiv geotropische Winterknospen um (Abb. 4). Die roten Ausläufer vertrockneten im Laufe des Winters zum Teil, wenige waren noch im Frühjahr auf dem

Abb. 3. Epilobium hirsutum gepfropft auf Oenothera biennis. Dicht über der Pfropfstelle und weiter oben abwärts wachsende Ausläuferprozesse

Abb. 4. Epilobium hirsutum gepfropft auf Oenothera biennis. Spitzen einzelner Seitenäste ausläuferartig verändert, abwärts gekrümmt, dann wieder aufgerichtet

blattlosen *Oenothera*-Stengel genügend ernährt, um in aufrechte normalbeblätterte Laubsprosse auszuwachsen, allerdings ohne zu blühen (Abb. 5).

4. *Oe. biennis gigas*-Stengel, darauf *Epil. hirsutum*, 2mal. Die Reiser entwickelten sich gut und blühten reich.

5. *Oe. Hookeri*-Stengel, darauf *Epil. hirsutum*, 2mal. Schön blühende Reiser.

6. *Oe. biennis*-Stengel, darauf *Epil. montanum*, 2mal. Die Reiser entwickelten sich sehr gut, viel besser als auf den Rosetten (wohl zufällig) und blühten reich.

7. *Epilobium hirsutum*-Stengel, darauf Zweige von *Oe. biennis*, 3mal. Die Reiser wuchsen gut an, bildeten keine Wurzeln (so auch sonst bei analogen Pfropfungen), blühten mittelmäßig, setzten aber gut Samen an.

8. *Epil. hirsutum*-Stengel, darauf Zweige von *Oe. biennis gigas*, 3mal. Die Reiser trugen schon Knospen, die Blüten gingen auf, blieben aber klein.

Abb. 5. Dieselbe Pflanze wie in Abb. 3 im folgenden Frühjahr. Ausläufer teilweise zu Laubsprossen ausgewachsen

9. *Epil. hirsutum*-Stengel, darauf junge Rosetten von *Oe. biennis*, teils als Gipfel aufgesetzt, teils seitlich angeschäftet, im ganzen 12mal; wuchsen nicht gut an und blieben kleine Rosetten, die nicht zur Blüte kamen.

Ergebnis. *Epilobium* auf *Oenothera* entwickelt sich sehr kräftig und durchaus normal, *Oenothera* auf *Epilobium* kümmert, wohl infolge mangelhafter Ernährung. Abgesehen von solcher Hemmung war keine Veränderung im Habitus der Reiser auf der gattungsfremden Unterlage zu erkennen. Auch die Blüten erschienen durchaus normal, bei *Epilobium* auf *Oenothera* sehr gesund und schön, eine Nachkommenschaft aus Samen solcher Blüten zeigte keine Spur von Abänderung. Die Reiser von *Epilob. hirsutum* bilden über der Pfropfstelle im Herbst Ausläufer.

Literatur

ESAU, K.: Plant Anatomy. New York u. London 1953. — GEITLER, L.: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. Protoplasmatologia, Bd. 6 C. Wien 1953. — GLUSTSCHENKO, I. J.: Die Vegetative Hybridisation von Pflanzen. 5. Beih. zur „Sowjetwissenschaft". Berlin 1950. — KOWALEWICZ, ROSE: Entwicklungsgeschichtliche Studien an normalen und cruciaten Blüten von Epilobium und Oenothera. Planta (Berl.) **46**, 569—603 (1956). — KÜSTER, E.: Die Pflanzenzelle, 2. Aufl. Jena 1951. — NETOLITZKY, F.: Die Kieselkörper. Die Kalksalze als Zellinhaltskörper. In Handbuch der Pflanzenanatomie, herausgeg. von K. LINSBAUER, Bd. III/1a. Berlin 1929. — POBEGUIN, THÉRÈSE: Les oxalates de calcium chez quelques Angiospermes. Ann. Sci. nat., 11. Ser. **4**, 1—93 (1943). — RENNER, O., u. Mitarb.: Zur Entwicklungsgeschichte von Oenothera und Epilobium. Z. Naturforsch. **7b**, 420—425 (1952). — SCHOCH-BODMER, HELEN, u. P. HUBER: Das Spitzenwachstum der Bastfasern bei Linum usitatissimum und Linum perenne. Ber. schweiz. bot. Ges. **61**, 377—404 (1951). — TISCHLER, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie. 1. Hälfte: Der Ruhekern. In Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. II, 2. Aufl. Berlin 1934.

Dr. ROSE KOWALEWICZ, Kloster Wald (Hohenzollern)

Planta, Bd. 47, S. 510—526 (1956)

Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

DIE VERWERTUNG ORGANISCHER SÄUREN DURCH CHLORELLA IM LICHT

Von

H.-G. Schlegel

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. April 1956)

Die oxydative Assimilation von Grünalgen ist in letzter Zeit Gegenstand mehrerer Untersuchungen gewesen (Watanabe 1937, Taylor 1950, Eny 1950, Syrett 1951, Daniel 1955, Kandler 1955, Bergmann 1955). Im wesentlichen handelt es sich dabei um Einbauversuche und Messung der O_2-Aufnahme mit Glucose als Substrat. Da sich bei diesen Untersuchungen ergeben hatte, daß Kohlendioxyd die untersuchten Prozesse nicht oder nur unbeträchtlich beeinflußt, wurde meistenteils nach der „$\pm$ KOH-Methode" nach Warburg vorgegangen. Bei der Umsetzung organischer Säuren, die Glieder des Tricarbonsäurecyclus sind oder mit solchen in naher Beziehung stehen, ist von vornherein nicht zu übersehen, inwieweit Kohlendioxyd und seine Entziehung auf den Stoffwechsel Einfluß nehmen. Es erschien daher angebracht, die Rolle des Kohlendioxyds bei der oxydativen Assimilation organischer Säuren zu untersuchen. Als Maß der Eignung einer Säure als Substrat wählten wir die Anreicherung von Polysacchariden, die nach der Anthronmethode bestimmbar sind. Es ist nicht zu verkennen, daß mit der Bestimmung der gebildeten Zellpolysaccharide nur ein Teil der synthetischen Leistungen der Zelle erfaßt wird und daß gerade organische Säuren unter bestimmten Bedingungen zur Synthese von Fetten und anderen Speicherstoffen oder sekundären Stoffen genutzt werden. So sollen die vorgelegten Versuche nur erste Anhaltspunkte für eine spätere eingehende Untersuchung des Stoffwechsels organischer Säuren bei Grünalgen liefern.

Über diese einer allgemeinen Orientierung dienenden Untersuchungen hinaus interessierte eine spezielle Frage. Geht man von der Vorstellung aus, daß das Licht im Stoffwechsel der Grünalgen keine andere Funktion habe, als die für die CO_2-Fixierung und -Reduktion notwendige Energie zu liefern, so wäre anzunehmen, daß die im Dunkeln ablaufende oxydative Assimilation organischer Substanzen und die photosynthetische CO_2-Fixierung im Licht zwei voneinander unabhängige Vorgänge sind. Auch im Licht würden sich Photosynthese und oxydative Assimilation nicht beeinflussen (Myers 1947).

Da beide Prozesse — Photosynthese und oxydative Assimilation — zur Bildung und Anreicherung im wesentlichen der gleichen Substanzen

führen, ist es denkbar, daß bei Ermöglichung beider Prozesse eine Konkurrenzhemmung eintritt. Unter diesem Aspekt wäre beispielsweise zu erwarten, daß bei optimal ablaufender Photosynthese (Lichtsättigung) die Aufnahme organischer Substanzen herabgesetzt wird. Nach neueren Vorstellungen (KANDLER 1950, ARNON u. Mitarb. 1954, ARNON 1955) erschöpft sich aber die Funktion der aufgenommenen Strahlungsenergie nicht in der CO_2-Assimilation. Die Energie wird anscheinend primär zum Aufbau energiereicher Phosphatverbindungen verwertet, die bei verschiedenen endergonen Syntheseleistungen nutzbar gemacht werden können.

Wie Vorversuche zeigten, wird die Säureaufnahme (Brenztraubensäure) durch *Chlorella* im Licht gefördert. Zur Erklärung dieser Erscheinung müssen mehrere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

1. Die im Licht ablaufende Photosynthese fördert durch O_2-Produktion die oxydative Assimilation.

2. Der Brenztraubensäure-Umsatz in den Zellen wird als Vorgang sui generis durch Licht direkt gefördert.

3. Durch die im Licht ablaufenden Phosphorylierungsprozesse wird zusätzlich Energie zur Verfügung gestellt, die die Säureassimilation begünstigt.

Einen Weg zur Klärung dieser Frage beizutragen, insbesondere zwischen 1. und 3. zu entscheiden, sehen wir in der Untersuchung der Säureaufnahme in Gegenwart und in Abwesenheit von CO_2. Wird der über einer Algensuspension befindlichen Atmosphäre das CO_2 laufend entzogen, so steht der Photosynthese nur das während der oxydativen Assimilation der organischen Säure gebildete Kohlendioxyd zur Verfügung und die Photosynthese wird stark beeinträchtigt. Wäre die photosynthetische Sauerstoffproduktion für den im Licht gesteigerten Säureumsatz verantwortlich (1.), so müßte bei Entziehen des normalen H-Acceptors CO_2 die Photosynthese und somit die Sauerstofflieferung und folglich auch der Säureumsatz gegenüber dem CO_2-haltigen Ansatz herabgesetzt sein. Handelt es sich aber um eine Konkurrenz von CO_2-Assimilierung und oxydativer Assimilation um die im Licht primär gebildeten energiereichen Verbindungen, so muß durch CO_2-Entzug infolge verhinderter Photosynthese die Säureaufnahme gegenüber dem CO_2-haltigen Ansatz gesteigert werden. Diese Fragen für die Verwertung von Brenztraubensäure und Essigsäure qualitativ und in einigen Punkten auch quantitativ zu klären, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

I. Organismen, Kultur, Apparatur und Methoden

1. *Chlorella pyrenoidosa*[1] wurde in einer Mineralsalzlösung (0,4 g KNO_3; 0,1 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$; 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$; 0,1 g KCl; 0,1 g KH_2PO_4;

[1] Der Stamm wurde freundlicherweise von Herrn Prof. E. G. PRINGSHEIM zur Verfügung gestellt.

Spur $Fe_2(SO_4)_3$; 1000 ml Wasser) unter Zusatz von 1% Erdabkochung in 50 cm langen Glasröhren von 7 cm Durchmesser herangezogen; die Kulturen wurden von einem 3% CO_2/Luftgemisch kräftig durchströmt und durch Weißlichtleuchtstoffröhren belichtet. Die Temperatur betrug 20 ± 2^0 C. Nach sechstägiger Kultur wurde abzentrifugiert, mehrmals mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und 48 Std im Luftstrom im Dunkeln verarmt. Nach erneutem Waschen wurde in m/20 Phosphatpuffer aufgeschwemmt.

2. Zur Bestimmung des Substratverbrauches und der Anreicherung von Kohlenhydraten in den Zellen unter verschiedenen Bedingungen bedienten wir uns einer selbstgefertigten Schüttelapparatur, in welcher jeweils gleichzeitig 24 50 ml-Erlenmeyerkölbchen in einem Wasserbad (Temp. 24 ± 1^0C) geschüttelt werden können, das von unten her durch drei nebeneinander angeordnete Warmton-Leuchtstoffröhren erleuchtet wird. Die Kölbchen waren mit Zentralgefäßen ausgestattet. Bei einigen wurden diese mit je 0,5 ml 20%iger Kalilauge und einem Fließpapierfächer versehen, andere Kölbchen wurden mit einem 3%igen CO_2/Luftgemisch durchströmt. Von jeder Gruppe wurde ein Teil mit Aluminiumfolie verdunkelt.

3. Für manometrische Untersuchungen stand eine Warburg-Apparatur mit 12 Manometern zur Verfügung. Die Schüttelgeschwindigkeit war konstant eingestellt und betrug 158 Hin- und Hergänge/min bei einer Schüttelamplitude von 2,5 cm. Die Badtemperatur betrug $25{,}1 \pm 0{,}02^0$C. Es kamen die üblichen Gefäße von $16{,}0 \pm 0{,}5$ cm³ Rauminhalt mit zwei seitlichen Ansätzen zur Verwendung. Der eine Seitenarm trug einen Durchlüftungsstopfen. Die Gefäße wurden mit Zellsuspension und Zusätzen ad 3,00 ml beschickt. Bei Dunkelversuchen wurde die ganze Apparatur verdunkelt. Bei Lichtversuchen erhellten zwei mit Reflektoren ausgerüstete 200 W-Opallampen, die im Abstand von 35 cm über der Wasseroberfläche aufgehängt waren, das innen weiß emaillierte Bad gleichmäßig.

Bei einigen orientierenden Versuchen wurde die übliche „± KOH-Methode" nach Warburg angewandt.

Im Laufe der Arbeit wurde es notwendig, die photosynthetische O_2-Produktion und die Substratatmung, sowie den Gaswechsel bei der Überlagerung beider Stoffwechselprozesse zu bestimmen. Da es die vorhandene apparative Ausrüstung nicht zuließ, die Veränderung des CO_2- und O_2-Gehaltes in den Gefäßen kontinuierlich zu bestimmen, begnügten wir uns damit, in gleichmäßig beschickten Gefäßen den O_2- und CO_2-Gehalt am Anfang und am Ende eines Versuches zu ermitteln und daraus die umgesetzten Gasmengen zu berechnen. Dazu schien das von Schatz (1952) und Clayton (1955) zur Untersuchung des Gaswechsels chemoautotropher Mikroorganismen angewandte Verfahren in zweckentsprechender Abwandlung am geeignetsten.

Die Gefäße waren folgendermaßen vorbereitet. In dem einen Seitenarm befanden sich 0,3 ml 3 n H_2SO_4, in dem mit dem Durchlüftungsstopfen ausgestatteten Seitenarm lag ein Fließpapierfächer. Die Hauptgefäße wurden mit der substrathaltigen (bzw. substratfreien Kontroll-) Suspension beschickt. Die Gefäße wurden in das Bad eingesetzt und mit Luft eines bestimmten CO_2-Gehaltes durchströmt. Einige Gefäße wurden durch Umkleiden mit Aluminiumfolie verdunkelt. Nach Einstellen des Temperaturgleichgewichtes wurde in Kontrollgefäßen zur Bestimmung des anfänglichen CO_2-Gehaltes die Schwefelsäure aus dem Seitenarm in das Hauptgefäß herübergeholt und abgelesen (Wert a). Zu diesem Zeitpunkt befand sich sämtliches Kohlendioxyd im Gasraum. Um dieses zu bestimmen, wurden durch den Durchlüftungsstopfen 0,2 ml oder ein anderes genau abgemessenes ähnliches Volumen 20%iger Kalilauge zugefügt. Zu diesem Zweck wurde die Capillare des Durchlüftungsstopfens mit einer Capillarpipette luftblasenfrei mit KOH gefüllt, über eine Schlauchverbindung eine Pipette fest aufgesetzt und bei geöffnetem Stopfen das gewünschte Volumen einfließen gelassen. Kleine Abweichungen lassen sich bei der Kalkulation berücksichtigen. Die Kalilauge wird von dem Fließpapierfächer aufgesaugt und absorbiert das gasförmige Kohlendioxyd. Nach Einstellung des Temperaturgleichgewichtes wurde abgelesen (Wert b). 15 min nach Zufügen der KOH ist die Absorption vollständig. Mit den Versuchsmanometern wurde am Ende der Versuchsdauer in gleicher Weise verfahren.

Aus den gemessenen Druckänderungen läßt sich der CO_2-Gehalt berechnen. Die zu Versuchsbeginn vorhandene CO_2-Menge beträgt $x\,CO_2^a = \left(a - b + \frac{200}{k_{O_2}}\right) \cdot k_{CO_2}$ und diejenige zu Versuchsende $x\,CO_2^e = \left(A - B + \frac{200}{K_{O_2}}\right) \cdot K_{CO_2}$. Aus beiden Größen ergibt sich $\Delta\,CO_2$ als Differenz $x\,CO_2^e - x\,CO_2^a$. Der Berechnung von $\Delta\,O_2$ wurde die Differenz $B - b$ zugrunde gelegt: $\Delta\,O_2 = (B - b) \cdot K_{O_2}$. Unterscheiden sich die Manometer in ihren Konstanten, was in der Regel zutreffen wird, so ist $(a - b)$ aus $\Delta\,CO_2$ nach $a - b = \frac{\Delta\,CO_2}{K_{CO_2}} - \frac{200}{K_{O_2}}$ für jedes Versuchsmanometer neu zu errechnen und zu berücksichtigen. Das angegebene Verfahren erlaubt in technischer wie in rechnerischer Hinsicht manche Verbesserungen und Verfeinerungen, dürfte aber unseren orientierenden Versuchen genügen.

4. Die Bestimmung der Zellpolysaccharide erfolgte mit dem Anthronreagens nach Fales (1951). Der Stoffwechselprozeß wurde durch Eiskühlung oder Zusatz von $^1/_{10}$ Vol. conc. $HgCl_2$-Lösung zur Suspension abgestoppt. Die Suspension wurde gewaschen, ein aliquoter Teil mit Anthronreagens (0,2 g Anthron in 8 ml 96% Alkohol und 30 ml Wasser gelöst und in 100 ml conc. H_2SO_4 unter Kühlung eingetragen) versetzt,

7 min im kochenden Wasserbad gehalten, abgekühlt und mit dem Elko II (Zeiß-Opton) unter Verwendung des Filters S 57 gegen eine Vergleichsprobe gemessen. Ausgewertet wurde nach einer mit Glucose aufgestellten Eichkurve. Die Extinktion ist bis zu $E = 1{,}1$ der Glucosekonzentration direkt proportional. Durch die Anthronmethode werden alle Kohlenhydrate erfaßt, die bei der Hydrolyse mit konzentrierter Schwefelsäure Oxymethylfurfurol bilden. Bei unseren Versuchen handelte es sich im wesentlichen um gespeicherte Stärke.

5. Bei der Brenztraubensäurebestimmung hielten wir uns an das von Wolf (1955) für die Bestimmung der Gesamt-Carbonylverbindungen angegebene Verfahren.

Um den Einfluß des Kohlendioxyds auf den Stoffwechsel ausgeprägt in Erscheinung treten zu lassen, wurden relativ dünne *Chlorella*-Suspensionen verwendet (2—8 mg Trockengewicht/ml). Die bei verschiedenen Versuchen verwendeten Suspensionsdichten variierten. Als Bezugsgrößen wurden das Trockengewicht oder der Gesamt-Zellstickstoff nach Kjeldahl ermittelt.

II. Ergebnisse

1. Polysaccharidbildung mit Glucose und organischen Säuren als Substraten

Der Umsatz organischer Säuren durch gewaschene Suspensionen von *Chlorella* wurde bisher nur an der O_2-Aufnahme messend verfolgt (Genevois 1927, Eny 1951, Kandler u. Ernst 1955). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden zunächst Glucose und eine Reihe organischer Säuren auf ihre Eignung als Substrat für die Polysaccharidsynthese ruhender Zellen geprüft. Es sollte dabei gleichzeitig der Einfluß des Lichtes und die Rolle des Kohlendioxyds erfaßt werden. Um in den CO_2-freien Ansätzen eine CO_2-Retention weitgehend zu unterdrücken, wurden die *Chlorella*zellen in einem m/20 Phosphatpuffer von p_H 5,0 aufgeschwemmt. Inwieweit die Bildung der Zellkohlenhydrate und -polysaccharide durch die Wasserstoffionenkonzentration beeinflußt wird, wurde nur mit Acetat als Substrat geprüft. Die Suspension wurde zu je 5 ml in Erlenmeyerkölbchen abgefüllt, mit den Substraten versehen und bei Licht und Dunkelheit, mit CO_2 in der Atmosphäre und unter CO_2-Absorption durch KOH geschüttelt. Nach mehreren Stunden wurden Proben entnommen, mit $HgCl_2$ abgestoppt und in aliquoten Teilen nach der Anthronmethode die Polysaccharide quantitativ bestimmt.

In jedem Falle wurde eine substratfreie Kontrolle denselben Versuchsbedingungen ausgesetzt wie die substrathaltigen Proben (Abb. 1). Bei Anwesenheit von CO_2 wurden im Licht auch ohne zugesetztes organisches Substrat Polysaccharide gebildet. Unter den gegebenen Bedingungen nahm der Gehalt an bestimmbaren Kohlenhydraten in 10 Std auf etwa das Doppelte zu. Ohne CO_2 war im Licht eine zwar geringe,

doch immerhin nachweisbare Polysaccharidbildung festzustellen. Da in den mit einem Gummistopfen verschlossenen und mit KOH im Zentralgefäß versehenen Gefäßen den Zellen kein exogenes Kohlendioxyd zur Verfügung stand, kann die Zunahme an Polysacchariden nur auf Kosten andersartiger Speicherstoffe erfolgt sein. Im Dunkeln war bei diesen bereits stark verarmten Zellen keine Veränderung des Polysaccharidgehaltes festzustellen. Die Dunkelproben entsprechen daher den Nullproben, die nicht mit aufgeführt wurden.

Mit Glucose als Substrat kommt es zu einer Polysaccharidsynthese, die größenordnungsmäßig die mit allen anderen Substraten erzielten Leistungen weit übertrifft. Um Sättigungseffekte zu vermeiden, führten wir mit Glucose lediglich sechsstündige Versuche durch. Die Säulendiagramme der Abb. 1 lassen die unter variierten Versuchsbedingungen erzielten Effekte rasch überschauen. Vergleichen wir zunächst die bei CO_2-Anwesenheit beobachteten Einbauleistungen. Glucose führt auch im Dunkeln zu einer bedeutenden Polysaccharidsynthese, wobei zur Gewinnung der beim Einbau aufzuwendenden Energie 11—13,5% (Daniel 1955) der zugesetzten Glucose zu Kohlendioxyd und Wasser oxydiert werden. Im Licht ist die Zunahme an Polysaccharid erheblich größer. Wären die im Dunkeln betriebene oxydative Assimilation der Glucose und die auf CO_2-Fixierung beruhende Polysaccharidsynthese im Licht zwei voneinander unabhängige Vorgänge, so wäre im Licht mit Glucose lediglich ein additiver Effekt zu erwarten. Die tatsächlich beobachtete Polysaccharidsynthese übersteigt aber die Summe der im Dunkeln mit Glucose und der im Licht mit CO_2 verzeichneten Syntheseleistungen bei weitem. Die Einflußnahme des Lichtes auf den Glucoseeinbau ist auf energetische Zusammenhänge zurückzuführen. Während der oxydativen Assimilation begrenzt den Dunkeleinbau der Glucose anscheinend die Verfügbarkeit der Einbauenergie. Da die Stärkesynthese über Glucose-1-phosphat verläuft und zu dessen Bildung in einer Hexokinase- und Phosphoglucomutase-Reaktion laufend ATP

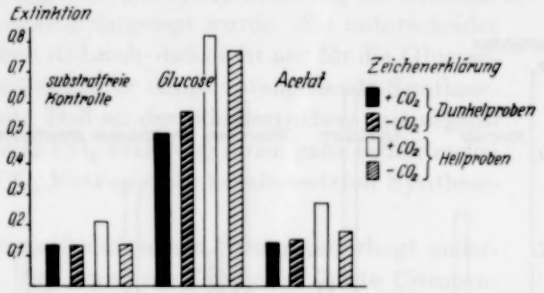

Abb. 1. Polysaccharidgehalt von *Chlorella*zellen nach sechsstündigem Schütteln im Dunkeln und im Hellen in CO_2-haltiger und CO_2-freier Atmosphäre mit Glucose (0,1 m) und Acetat (0,01 m) als Substrat in m/20 Phosphatpuffer pH 5,0; zum Vergleich die substratfreie Kontrolle. Die Extinktion ist dem Gehalt an anthronpositiven Zellpolysacchariden direkt proportional. Der Polysaccharidgehalt der substratfreien Kontrolle entspricht dem der verarmten Zellen (Nullprobe)

verbraucht wird, kann der begrenzende Vorgang in der Nachlieferung von ATP gesehen werden. Da im Licht eine „oxydative Phosphorylierung" (Vishniac u. Ochoa 1952) oder „photosynthetische Phosphorylierung" (Arnon u. Mitarb. 1954) ablaufen, die für eine laufende Regenerierung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat sorgen, kann die bedeutende Steigerung der Polysaccharidsynthese aus Glucose im Licht als Ausdruck einer „lichtabhängigen Phosphorylierung" (Kandler 1954) gewertet werden. Kandler kam bei der Messung der Glucoseabnahme im Medium zu gleichsinnigen, aber weniger signifikanten Werten.

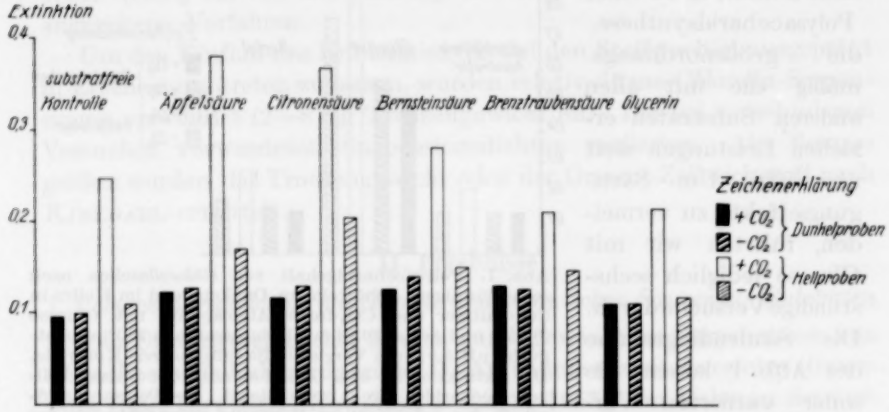

Abb. 2. Polysaccharidgehalt von *Chlorella*zellen nach fünfzehnstündigem Schütteln im Dunkeln und im Hellen in CO_2-haltiger und CO_2-freier Atmosphäre mit verschiedenen Substraten (Äpfelsäure 0,1 m, Citronensäure 0,05 m, Bernsteinsäure 0,05 m, Brenztraubensäure 0,1 m, Glycerin 0,05 m) in m/20 Phosphatpuffer pH 5,0. Mittel aus drei gleichartigen Versuchen

Der Entzug von Kohlendioxyd wirkt sich auf die Polysaccharidsynthese mit Glucose als Substrat nur unwesentlich aus. Die Syntheseleistung wird im Licht nur um ein Geringes herabgesetzt. Weshalb der CO_2-Entzug im Dunkeln zu einer gegenüber der CO_2-haltigen Dunkelprobe gesteigerten Stärkesynthese führt, kann vorläufig nur vermutet und als Zugmechanismus gedeutet werden: Durch Entziehung des im Tricarbonsäurecyclus gebildeten Kohlendioxyds wird das Gleichgewicht zugunsten des Abbaus verschoben; durch diese Beschleunigung des Kreisprozesses werden reduzierte Pyridinnucleotide der Atmungskette in erhöhtem Maße zur Verfügung gestellt, was wiederum eine gesteigerte ATP-Produktion zur Bildung von Glucose-1-phosphat und zur Stärkesynthese zur Folge hat.

Gegenüber der mit Glucose als Substrat beobachteten Synthese sind die durch organische Säuren bewirkten Syntheseleistungen minimal (Abb. 1 und 2). Zur Erlangung deutlicherer Unterschiede wurde die Versuchsdauer auf 15 Std heraufgesetzt. Die oxydative Assimilation, die

bei organischen Säuren als Substraten mit einem erheblich geringeren Wirkungsgrad verläuft, geht sehr langsam vor sich und führt zu einer nur geringen Zunahme von Zellpolysacchariden. Die schon bei der Glucoseoxydation beobachtete synthesefördernde Wirkung des CO_2-Entzugs trat auch hier auf. Bei Vorhandensein von CO_2 erfolgt im Licht eine bedeutende Polysaccharidsynthese. Es wird dabei — vor allem im Falle der Citronen- und Äpfelsäure — mehr Stärke gebildet als der Summe von Dunkelassimilation und Licht-CO_2-Fixierung entspricht. Die Erscheinung ist im großen ganzen ähnlich zu erklären, wie oben für den lichtabhängigen Glucoseeinbau dargelegt wurde. Sie unterscheidet sich von diesem im wesentlichen dadurch, daß nicht nur für die Glucosephosphorylierung, sondern zusätzlich für einige vorangehende Syntheseschritte Energie benötigt wird. Daß an der Stärkesynthese mit organischen Säuren als Substraten eine CO_2-Fixierung einen ganz bedeutenden Anteil hat, geht aus der bei CO_2-Entzug stark herabgesetzten Syntheseleistung hervor.

Das Ausmaß der Verwertung der einzelnen Säuren unterliegt außerordentlichen Schwankungen. Bei einzelnen Versuchen führte Citronensäure zu höheren Polysaccharidgehalten als Äpfelsäure. Die Aktivitäten sind vom physiologischen Zustand des Algenmaterials in hohem Grade abhängig.

2. Umsatz von Brenztraubensäure im Dunkeln und im Licht

Brenztraubensäure wird durch *Chlorella* nur sehr langsam umgesetzt (Kandler u. Ernst 1955). Die durch BTS bewirkte Steigerung der Gasaufnahme ist so gering, daß der Rückgang der Substratatmung nach Aufbrauch von BTS nicht genügend signifikant in Erscheinung tritt. Es wurde deshalb nicht die durch sie bewirkte Atmungssteigerung verfolgt, sondern die Aufnahme von BTS an ihrer Abnahme im Suspensionsmedium bestimmt. Die direkte Erfassung der BTS wurde durch ihre leichte Bestimmbarkeit ermöglicht.

Eine *Chlorella*suspension (m/20 Phosphatpuffer p_H 5,1; 50 μg BTS/ml) wurde zu je 5 ml in Kölbchen aufgeteilt und im Dunkeln und im Licht mit 5% CO_2 im Gasraum bzw. KOH im Zentralgefäß bei 24 $\pm$ 1° C geschüttelt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen. Wie Abb. 3 zeigt, wird BTS im Licht erheblich rascher aufgenommen als im Dunkeln. Die diskutable Möglichkeit, daß es sich dabei lediglich um eine Stimulation handelt, die durch den im Licht erhöhten O_2-Partialdruck in der Zelle bedingt ist, prüften wir durch einen Vergleichsversuch mit reinem Sauerstoff als Gasatmosphäre (Abb. 4). Unter diesen Bedingungen wird der BTS-Umsatz sogar herabgesetzt. Atmungsversuche im Warburgapparat ergaben ebenfalls, daß unter O_2-Atmosphäre Leeratmung und Substratatmung in gleichem Maße und nur sehr gering

erhöht werden. Die Erhöhung des BTS-Umsatzes im Licht dürfte demnach andere Ursachen haben. Substratatmung und Photosynthese sind anscheinend keine derart unabhängigen Prozesse, daß sie sich allein durch ihre Endprodukte (CO_2 bzw. O_2) beeinflussen. Es ist anzunehmen,

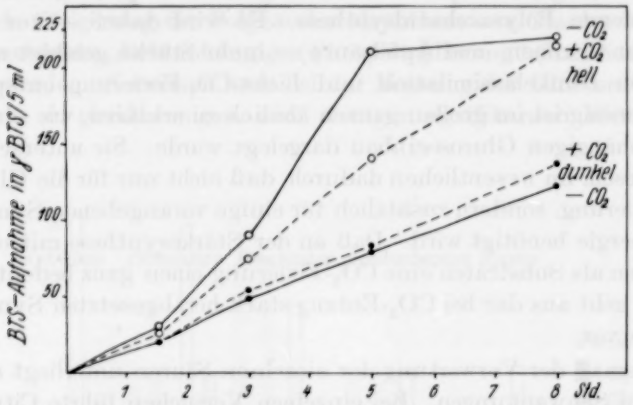

Abb. 3. Brenztraubensäureaufnahme durch *Chlorella* im Licht (○) und im Dunkeln (●) mit (------) und ohne (——) CO_2

daß im Licht der Stoffwechsel organischer Säuren in andere Bahnen gelenkt wird als im Dunkeln. Die im Licht ablaufenden Phosphorylierungsprozesse und die fortwährende Bildung von reduziertem DPN lassen eine tiefgreifende Veränderung des Stoffwechsels organischer Substrate durchaus möglich erscheinen. Die im Licht gebildeten energiereichen Verbindungen dürften dann nicht nur der CO_2-Fixierung dienen, sondern auch für Einbauleistungen genutzt werden. Auf den BTS-Umsatz im Licht hat die Anwesenheit oder Absorption von CO_2 tatsächlich eine außerordentliche Wirkung. Gegenüber Ansätzen, die 5% CO_2 in der Luftatmosphäre enthielten, wird die BTS-Aufnahme in Ansätzen, die kein zusätzliches CO_2 erhielten oder mit KOH in den Zentraleinsätzen versehen waren, deutlich erhöht. Die laufende Entfernung von CO_2 beschleunigt die BTS-Aufnahme. Anscheinend handelt es sich in diesem Falle wirklich um eine Konkurrenz von CO_2-Fixation und Substrateinbau um die verfügbare Energie, wie einleitend erwogen wurde.

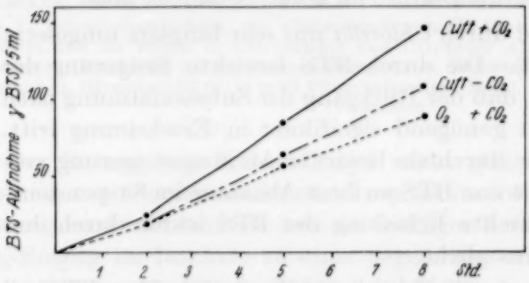

Abb. 4. Brenztraubensäureaufnahme durch *Chlorella* im Dunkeln unter Luft mit und ohne CO_2 und unter O_2-Atmosphäre mit CO_2

3. Umsatz von Essigsäure im Dunkeln und im Licht

Zunächst wurden einige orientierende Versuche über die Konzentrations- und p_H-Abhängigkeit der Veratmung von Essigsäure im Dunkeln angestellt. Der Zusatz von Essigsäure zu einer *Chlorella*suspension führt zu einer Atmungssteigerung, die der bei Glucosezusatz beobachteten annähernd gleichkommt. Der Effekt ist aber außerordentlich konzentrationsabhängig. Bei unseren Versuchen wirkten schon Konzentrationen über 0,02 mol/l stark hemmend. Bei Konzentrationen zwischen 0,005 und 0,01 mol maßen wir die höchsten Umsatzraten, weshalb bei weiteren Versuchen die Anfangskonzentration an Essigsäure in diesen

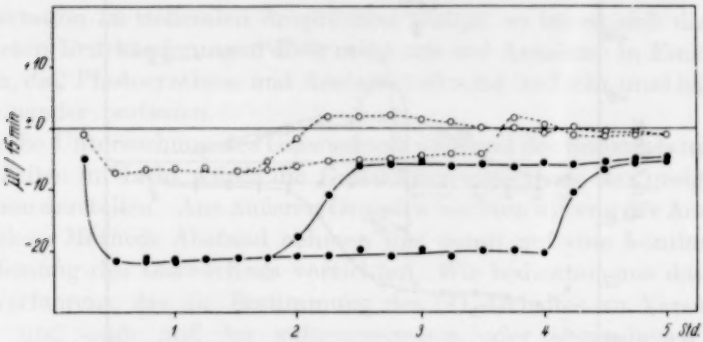

Abb. 5. Gaswechsel beim Umsatz von 6 und 12 µM Na-Acetat im Dunkeln (●—●) und im Schwachlicht (○···○) durch *Chlorella*; m/20 Phosphatpuffer pH 5,0

Grenzen gehalten wurde. Die Ergebnisse stimmen mit den von KANDLER u. ERNST (1955) an einem anderen Stamm von *Chlorella pyrenoidosa* erhobenen Befunden gut überein. Im Bereich zwischen p_H 5,4 und 7,2 war die O_2-Aufnahme etwa gleich groß. Unterhalb und oberhalb dieses Bereiches sank die Umsatzrate ab (NIELSEN 1955). Zur Vermeidung einer nennenswerten CO_2-Retention im Medium wurde das p_H bei den meisten Versuchen mit Phosphatpuffer auf p_H 5,0 oder 5,2 eingestellt.

Um zu prüfen, ob Licht auf den Umsatz von Acetat eine ähnliche fördernde Wirkung hat wie auf den von BTS, wurde die Acetatatmung im Warburgapparat im Dunkeln mit der im Schwachlicht verglichen (Abb. 5). Hatten die 2 150W-Opallampen einen Abstand von 1,2 m von der Thermostatoberfläche, so war die Atmung gerade überkompensiert. In allen Gefäßen befand sich *Chlorella*suspension in m/20 Phosphatpuffer p_H 5,2, im Zentralgefäß KOH, im Seitenarm 6 bzw. 12 µM Acetat. Ein Teil der Gefäße war verdunkelt, ein Teil dem Schwachlicht ausgesetzt. Nach 15 min wurde Acetat gekippt. Es erfolgt eine O_2-Aufnahme, die bei der verdunkelten Serie beträchtlich größer ist als bei der belichteten. Bei der verdunkelten Serie fällt die Gasaufnahme nach 2 bzw. 4 Std auf den Wert der Leeratmung ab. Im belichteten Ansatz

kommt es nach dem Verbrauch des Acetats zu einer vorübergehenden Gasproduktion. Der Kurvenverlauf bringt den im Licht beschleunigten Acetatumsatz gut zum Ausdruck. Im Licht sinkt die Gasaufnahme früher ab als im Dunkeln. Demnach wird Acetat ebenso wie BTS im Licht rascher umgesetzt als im Dunkeln. Dafür dürfte hier das im Licht erhöhte Angebot an Reduktionskraft ($DPNH_2$) und Energie gleichermaßen verantwortlich zu machen sein, wie oben für BTS diskutiert wurde.

Über die bei der Belichtung von acetatoxydierenden *Chlorella*zellen zu erwartenden Effekte orientierten einige Warburg-Versuche, bei denen

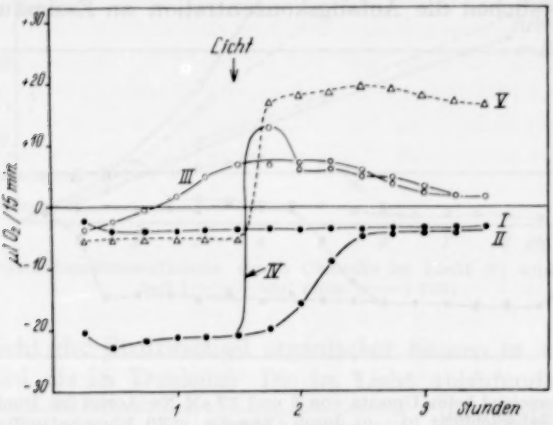

Abb. 6. Sauerstoffaufnahme und -produktion durch 24 Std im Luftstrom verarmte *Chlorella*suspension im Dunkeln und im Licht; 25° C; 6 μM Acetat; m/20 Phosphatpuffer pH 5,4. Erklärung im Text

in Parallelgefäßen mit und ohne KOH im Dunkeln die O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe und im Licht die CO_2-Aufnahme und O_2-Abgabe gemessen wurden (Abb. 6). Die Opallampen hatten bei diesen Versuchen einen Abstand von nur 30 cm von der Thermostatenoberfläche (siehe Abschnitt I Methoden). Nach Temperatureinstellung wurden zu 2,5 ml *Chlorella*suspension 6 μM Acetat aus dem Seitenarm herübergeholt. Die Leeratmung betrug 3—5 μl O_2/15 min und blieb während der Versuchsdauer auf etwa gleicher Höhe (Kurve I). Der RQ hatte einen Wert von 0,98. Für die Acetatoxydation (Kurve II) wurden bei fünf gleichartigen Versuchen RQ-Werte zwischen 1,01 und 1,06 ermittelt. Nach 2 Std fiel die O_2-Aufnahme nahezu auf den Wert der O_2-Leeraufnahme ab.

Wurden Gefäße mit Acetat und KOH von Anfang an belichtet, so folgte auf eine anfängliche Gasaufnahme eine O_2-Produktion, die nach Aufbrauch des Acetats zurückging (Kurve III). Ohne Acetat mit KOH war im Licht kein nennenswerter Gaswechsel festzustellen (nicht eingezeichnet). In Gefäßen mit Acetat und KOH, die erst eine Zeitlang verdunkelt blieben, erfolgt bei Belichtung ein beträchtlicher Druck-

anstieg (Kurve IV), der nach 15 min bereits wieder auf das Niveau der Kurve III abfällt. Diese momentane Gasausscheidung nach Belichtung kommt anscheinend dadurch zustande, daß infolge unvollständiger CO_2-Absorption der CO_2-Gehalt in den Zellen und im Medium so hoch ist, daß kurzfristig eine Photosynthese mit optimaler O_2-Produktion ablaufen kann. In Gefäßen, die Acetat und in der Gasatmosphäre 2% CO_2 enthielten (Kurve V), sinkt im Dunkeln der Druck ab; im Licht kommt es zu einem außerordentlichen Druckanstieg, was darauf hindeutet, daß bei der Acetatoxydation im Licht mehr Sauerstoff abgegeben als Kohlendioxyd aufgenommen wird. Wenn dieser Versuch auch in keiner Weise den an einen exakten Photosyntheseversuch und seine Interpretation zu stellenden Ansprüchen genügt, so lassen sich die beobachteten Druckänderungen doch nicht mit der Annahme in Einklang bringen, daß Photosynthese und Acetatveratmung im Licht unabhängig nebeneinander herlaufen.

Für die Untersuchung des Gaswechsels während der Substratatmung durch Zellen im Licht würde die Gefäßdifferenzmethode das geeignete Verfahren darstellen. Aus äußeren Gründen mußten wir von der Anwendung dieser Methode Abstand nehmen und damit auf eine kontinuierliche Messung des Gaswechsels verzichten. Wir bedienten uns deshalb eines Verfahrens, das die Bestimmung des CO_2-Gehaltes zu Versuchsanfang und -ende und des aufgenommenen oder abgegebenen O_2-Volumens erlaubte. Es handelt sich dabei um eine zweckentsprechende Abwandlung des von SCHATZ (1952) und CLAYTON (1955) im Laboratorium von VAN NIEL ausgearbeiteten Verfahrens; es wurde im methodischen Teil ausführlich dargelegt.

Die Gefäße wurden mit *Chlorella*zellen (6—7 mg Fr.Gew. je Gefäß); Phosphatpuffer p_H 5,6; 20 μM Acetat und im Seitenarm mit 0,3 ml 3 n H_2SO_4 beschickt. Anschließend wurde mit 1,7% CO_2 angereicherte Luft durchgeleitet. Einige Gefäße wurden dunkel gehalten, einige dem Licht ausgesetzt. Nach der oben beschriebenen Methode wurden so an jeweils zwei parallelen Versuchsansätzen die Produktion bzw. Aufnahme von CO_2 und O_2 während $1^1/_2$ bis $2^1/_2$stündiger Laufzeiten gemessen (Tabellen 1 und 2). Die Versuche erbrachten die auf Grund der Voruntersuchung erwarteten Ergebnisse. Die an Parallelansätzen und bei Wiederholungen gemessenen Werte stimmten weitgehend überein und versprechen bei weiterer Verfeinerung eine vielseitige Anwendbarkeit der Methode.

Für die Leeratmung (1. ohne Substrat, dunkel) betrug der RQ etwa 1, in der Mehrzahl der Fälle lag er darunter. Je nach dem Grad der Verarmung atmete die Suspension mit einem Q_{O_2} von 2—2,5 (μl O_2/mg Fr.Gew. u. Std). Während der Oxydation von Acetat (3. mit Substrat, dunkel) wurde etwa die dreifache Menge Sauerstoff aufgenommen. Der

Tabelle 1. *Gaswechsel einer Chlorellasuspension mit und ohne Acetat im Licht und im Dunkeln*

Bedingungen	$x\,CO_2^a$	$x\,CO_2^e$	$\Delta\,CO_2$	$\Delta\,O_2$	$\Delta\,O_2/-\Delta\,CO_2$	$\Delta\,CO_2/-\Delta\,O_2$
1. ohne Substrat, dunkel	310	330	+ 20	− 21	—	0,95
2. ohne Substrat, hell		191	− 119	+ 132	1,11	—
3. mit Substrat, dunkel		376,5	+ 66,5	− 62	—	1,07
4. mit Substrat, hell		301	− 9	+ 51	5,66	—

Chlorella (6,7 mg Fr.Gew.) in m/20 Phosphatpuffer p_H 5,6 suspendiert; 20 μM Acetat; Versuchsdauer 90 min; $x\,CO_2^a$ = zu Anfang, $x\,CO_2^e$ = zu Ende des Versuchs vorhandene Menge CO_2. Alle Angaben in μl.

Q_{O_2} schwankte zwischen 6 und 8. Der *RQ* lag durchweg über 1. Dies stimmt mit dem theoretischen Wert überein.

Ohne Acetat wurde im Licht CO_2 aufgenommen und O_2 abgegeben. Die Leeratmung war etwa 6fach überkompensiert. Die Sauerstoffproduktion war in allen Fällen größer als die CO_2-Aufnahme, der assimilatorische Quotient betrug 1,1 bis 1,2. Er nahm besonders hohe Werte an, wenn im Laufe des Versuchs das der Gasphase zugesetzte Kohlendioxyd aufgebraucht wurde ($\Delta O_2/-\Delta CO_2 = 1{,}5$—$1{,}6$). Es ist möglich, daß unter diesen Bedingungen des N- und CO_2-Mangels auf Kosten der Kohlenhydrate eine Fettsynthese überwiegt. Die Ergebnisse zeigen, daß mit der angewandten Methode hinreichend genaue Ergebnisse zu erzielen sind.

Wurde die Suspension mit Acetat dem Licht ausgesetzt, so wurde ebenfalls CO_2 aufgenommen und O_2 produziert. Die Photosynthese überstieg demnach bei der angewandten Lichtintensität die Substratatmung. Wenn Substratatmung und CO_2-Assimilation unabhängig voneinander wären, müßte der Quotient O_2/CO_2 etwa 1 sein. Das Verhältnis beider Gase ist aber stets erheblich größer. Der Gaswechsel beim Acetatumsatz im Licht entspricht also keineswegs der Summe der Dunkeloxydation von Acetat und Photosynthese. Der Stoffwechsel des Acetats scheint im Licht in andere Bahnen gelenkt zu werden und ein Vorgang sui generis zu sein. Acetat wird offensichtlich unter Reduktion

Tabelle 2. *Gaswechsel einer Chlorellasuspension mit und ohne Acetat im Licht und im Dunkeln*

Bedingungen	$x\,CO_2^a$	$x\,CO_2^e$	$\Delta\,CO_2$	$\Delta\,O_2$	$\Delta\,O_2/-\Delta\,CO_2$	$\Delta\,CO_2/-\Delta\,O_2$
1. ohne Substrat, dunkel	288	324	+ 36	− 37	—	0,97
2. ohne Substrat, hell		52,5	− 235,5	+ 272	1,15	—
3. mit Substrat, dunkel		391,5	+ 103,5	− 100,5	—	1,03
4. mit Substrat, hell		244,5	− 43,5	+ 133,6	3,07	—

Chlorella (7,0 mg Fr.Gew.) in m/20 Phosphatpuffer p_H 5,6; 20 μM Acetat. Versuchsdauer 150 min.

durch den bei der Photolyse des Wassers aktivierten Wassertoff eingebaut. Anscheinend entstehen vorwiegend Verbindungen, die stärker reduziert sind als Kohlenhydrate, wie Fette und Terpene.

Dieser Befund würde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von CALVIN u. Mitarb. (1951) stehen, die bei Verfütterung markierten Acetats an *Scenedesmus* im Licht vorwiegend eine Fettsynthese beobachteten, hinter der die Kohlenhydratbildung weit zurücktrat. Gleichlautende Ergebnisse liegen über *Nostoc muscorum* vor (ALLISON u. Mitarb. 1953).

In Abb. 7 ist der Verlauf des Gaswechsels während der Acetatoxydation im Licht dargestellt. Daß das Verhältnis $\Delta O_2/-\Delta CO_2$ von 3,4 (während der ersten 2 Std) auf 2,5 (nach $3^1/_2$ Std) absinkt, ist auf den Aufbrauch des zugesetzten Acetats (nach etwa $2^1/_2$ Std) zurückzuführen.

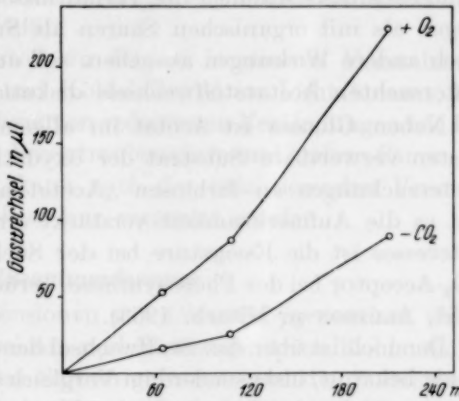

Abb. 7. Verlauf von CO_2-Aufnahme und O_2-Produktion während der Acetatoxydation durch *Chlorella* im Licht. Die Gefäße wurden mit 1,7 % CO_2/Luftgemisch im Gasraum gefüllt. Zu den angegebenen Zeiten wurde mit H_2SO_4 abgestoppt und das restliche CO_2 und der abgegebene O_2 bestimmt

Die mitgeteilten Versuche vermitteln einen kleinen Einblick in das Zusammenspiel von oxydativer Assimilation und Photosynthese bei *Chlorella*. Die geschilderten Methoden sind geeignet, für die Aufhellung des Stoffwechsels organischer Substrate durch Grünalgen im Licht erste Anhaltspunkte zu liefern. Exakte quantitative und qualitative Daten und ein schärfer umrissenes Bild wird aber erst die Verwendung mit C^{14} markierter Verbindungen gewinnen lassen.

III. Diskussion

Die vorgelegten Versuchsergebnisse gestatten zwischen den in der Einleitung skizzierten denkbaren Mechanismen zu entscheiden, durch die der Umsatz von Brenztraubensäure im Licht gegenüber der Dunkelkontrolle beschleunigt wird. Der Einbau organischer Substanzen scheint durch die Versorgung mit Energie begrenzt zu werden. Im Dunkeln wird die zum Einbau benötigte Energie durch vollständige Oxydation eines Teils der organischen Substanz gewonnen. Wird von der Zelle durch Strahlungsabsorption zusätzlich Energie aufgenommen, welche den Reaktionsorten höchstwahrscheinlich in Form von energiereichen Phosphatverbindungen (ATP) zugeleitet wird, so kann die Geschwindigkeit des Einbaus und infolgedessen auch die Aufnahme organischer Substanzen

erhöht werden. Von dieser Vorstellung ausgehend hat Kandler (1954), dessen Ergebnisse somit eine schöne Bestätigung finden, an Hand des Glucoseeinbaus die Bedingungen der lichtabhängigen Phosphorylierung untersucht.

Der im Licht ausgeprägt in Erscheinung tretende Effekt der CO_2-Entziehung, die BTS-Aufnahme erheblich zu fördern, stützt darüber hinaus die Vorstellung, daß CO_2-Fixierung und Substrateinbau zwei um die verfügbare Energie konkurrierende Prozesse sind. Im Falle des Glucoseeinbaus scheinen die Verhältnisse jedoch erheblich einfacher zu liegen als mit organischen Säuren als Substraten. Daß von letzteren noch andere Wirkungen ausgehen, soll am Beispiel des von uns besser untersuchten Acetatstoffwechsels diskutiert werden.

Neben Glucose ist Acetat im allgemeinen das bei Grünalgen am besten verwertbare Substrat der oxydativen Assimilation. Durch die Untersuchungen an farblosen „Acetatflagellaten" (Pringsheim 1937) hat es die Aufmerksamkeit verstärkt erregt. In den Mittelpunkt des Interesses ist die Essigsäure bei der Suche nach dem C_2-Körper, dem CO_2-Acceptor bei der Photosynthese, gerückt worden (Calvin u. Mitarb. 1951, Allison u. Mitarb. 1953).

Dennoch ist über den Stoffwechsel der Essigsäure bei Grünalgen sehr wenig bekannt, insbesondere im Vergleich mit unseren Kenntnissen über die entsprechenden Leistungen bei Purpurbakterien. Wenn auch Acetat begünstigt zu Fett synthetisiert zu werden scheint, so ist die Beteiligung des Kohlendioxyds und die Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel bei Licht und Dunkelheit nahezu unerforscht (Fogg 1953). Bei Durchströmung von *Chlorella*kulturen, die Glucose oder Acetat als Substrat enthielten, mit CO_2-freier Luft wurde das Wachstum im Licht nicht verbessert; mit Acetat als Substrat wirkte Licht bei CO_2-Abwesenheit sogar hemmend (Phillips 1951). Auch die von Kandler u. Frank (1955) mitgeteilten Beobachtungen über eine Hemmwirkung organischer Säuren auf den Ammonium- und sogar den Glucoseeinbau sprechen für eine ganz besondere Einflußnahme organischer Säuren auf den Stoffeinbau. Zu erwägen wäre, ob nicht auch in diesen Fällen organische Säuren, insbesondere Acetat, den Stoffwechsel in andere Bahnen lenken und die Fettsäuresynthese begünstigen. Im Dunkeln könnte diese Umsteuerung mangels Nachlieferung von reduziertem DPN nicht so stark zum Tragen kommen wie im Licht. Die Acetatfütterung dürfte auf direktem oder indirektem Wege den Gehalt der Zelle an Acetyl-CoA steigern. Im Licht wären dann alle Voraussetzungen — erhöhtes $DPNH_2$-Angebot, ATP und Acetyl-CoA — für ein Überwiegen der Fettsäuresynthese gegeben (Lynen 1955).

Daß in unseren Versuchen selbst ohne Acetat im Licht Assimilationsquotienten gemessen werden, die über 1 liegen, mag auch auf die Licht-

verhältnisse zurückzuführen sein. Die Algen wurden im Schwachlicht bei guter Nährsalz- und optimaler CO_2-Versorgung herangezogen — Bedingungen, unter denen vorwiegend Kohlenhydrate synthetisiert und gespeichert werden. Die Versuche wurden unter N-Mangel und bei höheren Lichtintensitäten durchgeführt; diese Bedingungen dürften den $DPNH_2$-Spiegel in der Zelle erhöhen und zusammen mit dem allmählich eintretenden CO_2-Mangel einer Fettsäuresynthese Vorschub leisten, die sich in einer Erhöhung des Assimilationsquotienten zu erkennen gibt. Über eine Fettspeicherung unter N-Mangel liegen mehrere Mitteilungen vor (Aach 1952, Milner 1948).

Der hohe Sauerstoffausstoß, zu dem es in unseren Versuchen bei Vorhandensein von Acetat und Kohlendioxyd im Licht kommt, kann nur mit einer forcierten Bildung von reduzierten Verbindungen wie Fettsäuren erklärt werden. Daß Brenztraubensäure und andere Säuren eine ähnliche Wirkung ausüben, kann nach den orientierenden Versuchen über die Kohlenhydratsynthese nur vermutet werden.

Zusammenfassung

1. Stark verarmte Suspensionen von *Chlorella pyrenoidosa* wurden im Licht und im Dunkeln, bei An- und Abwesenheit von Kohlendioxyd, mit Glucose und organischen Säuren gefüttert und die Zunahme der Zellpolysaccharide nach der Anthronmethode bestimmt. Mit Glucose, Äpfelsäure, sowie Citronensäure als Substraten übersteigt die Polysaccharidsynthese im Licht ($+CO_2$) die Summe der im Licht mit CO_2 (photosynthetische CO_2-Assimilation) und im Dunkeln mit Substrat (oxydative Assimilation) erzielten Syntheseleistungen. Der Effekt wird als Folge einer zusätzlichen Energieaufnahme und lichtabhängigen Phosphorylierung gedeutet.

2. Die Messung des Brenztraubensäureverbrauchs unter vier verschiedenen Versuchsbedingungen ($\pm$ Licht, $\pm$ CO_2) zeigte, daß die Säure im Licht rascher umgesetzt wird als im Dunkeln. Durch CO_2-Entziehung im Licht wird der Umsatz noch erhöht. Säureeinbau und photosynthetische CO_2-Fixierung konkurrieren anscheinend um die verfügbare Energie.

3. Zur Erfassung des Gaswechsels beim Umsatz organischer Substrate durch Grünalgen im Licht wird eine manometrische Methode angegeben. Während des Acetatumsatzes im Licht nimmt der Assimilationsquotient ($O_2/-CO_2$) Werte an (> 1), die auf eine überwiegende Fettsäuresynthese hinweisen.

Literatur

Aach, H. G.: Über Wachstum und Zusammensetzung von Chlorella pyrenoidosa bei unterschiedlichen Lichtstärken und Nitratmengen. Arch. Mikrobiol. **17**, 213—246 (1952). — Allison, R. K., H. E. Skipper, M. R. Reid, W. A. Short

and G. L. Hogan: Studies on the photosynthetic reaction. I. The assimilation of acetate by Nostoc muscorum. J. of biol. Chem. **204**, 197—205 (1953). — Arnon, D. I.: The chloroplast as a complete photosynthetic unit. Science (Lancaster, Pa.) **122**, 9 (1955). — Arnon, D. I., M. B. Allen and R. R. Whatley: Photosynthesis by isolated chloroplasts. Nature (Lond.) **174**, 394—396 (1954). — Bergmann, L.: Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen. II. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß mineralischer Faktoren bei heterotropher und mixotropher Ernährung. Flora (Jena) **142**, 493—539 (1955). — Calvin, M., J. A. Bassham, A. A. Benson, V. H. Lynch, C. Quellet, L. Schou, W. Stepka and N. E. Tolbert: Carbon dioxide assimilation in plants. Symposia Soc. exper. Biol. **5**, 284—305 (1951). — Clayton, K.: Photosynthesis and respiration in Rhodospirillum rubrum. Arch. Mikrobiol. **22**, 180—194 (1955). — Daniel, A. L.: Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen. III. Atmung und oxydative Assimilation von Chlorella. Flora (Jena) **143**, 31—66 (1956). — Eny, D. M.: Respiration studies on Chlorella. II. Influence of various organic acids on gas exchange. Plant Physiol. **26**, 268—289 (1951). — Fales, F. W.: The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. J. of biol. Chem. **193**, 113—124 (1951). — Fogg, G. E.: The Metabolism of Algae. New York: J. Wiley & Sons 1953. — Gaffron, H.: Über Anomalien des Atmungsquotienten von Algen aus Zuckerkulturen. Biol. Zbl. **59**, 288—302 (1939). — Genevois, L.: Über Atmung und Gärung in grünen Pflanzen. Biochem. Z. **186**, 461—473 (1927). — Kandler, O.: Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese I. Z. Naturforsch. **5**b, 423—437 (1950). — Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese II. Gesteigerter Glucoseeinbau im Licht als Indikator einer lichtabhängigen Phosphorylierung. Z. Naturforsch. **9**b, 625—644 (1954). — Kandler, O., u. H. Ernst: Über den Einfluß organischer Säuren auf die Atmung, den Ammoniumeinbau und den Gehalt an freien Aminosäuren von Chlorella. Planta (Berl.) **46**, 46—69 (1955). — Kandler, O., u. H. Frank: Vortrag, Biochem Arbeitstagung in Gatersleben 3.—6. Juli 1955. — Lynen, F.: Der Fettsäurecyklus Angew. Chem. **67**, 463—470 (1955). — Milner, H. W.: The fatty acids of Chlorella J. of biol. Chem. **176**, 813—817 (1948). — Myers, J.: Oxidative assimilation in relation to photosynthesis in Chlorella. J. gen. Physiol. **30**, 217 (1947). — Nielsen, E. St.: Influence of p_H on the respiration in Chlorella pyrenoidosa. Physiol. Plantarum (Copenh.) **8**, 106 (1955). — Phillips, J. N.: Unveröffentlicht, zit. nach J. Myers. Physiology of the Algae. Annual Rev. Microbiol. **5**, 157—180 (1951). — Pringsheim, E. G.: Assimilation of different organic substances by saprophytic flagellatae. Nature (Lond.) **139**, 196 (1937). — Schatz, A.: Uptake of carbon dioxide, hydrogen and oxygen by Hydrogenomonas facilis. J. gen. Microbiol. **6**, 329—335 (1952). — Syrett, P. J.: The effect of cyanide on the respiration and the oxydative assimilation of glucose by Chlorella vulgaris. Ann. of Bot. **15**, 473—492 (1951). — Taylor, F. J.: Oxidative assimilation of glucose by Scenedesmus quadricauda. J. of exper. Bot. **1**, 301—321 (1950). — Tang, P. S.: Studies on the kinetics of cell respiration. VI. Respiration of Chlorella pyrenoidosa in the presence of lactates. J. cell. a. comp. Physiol. **10**, 499—511 (1937). — Vishniac, W., and S. Ochoa: Fixation of carbon dioxide coupled to photochemical reduction of pyridine nucleotides by chloroplast preparations. J. of biol. Chem. **195**, 75—93 (1952). — Watanabe, A.: Untersuchungen über die Substrate für Sauerstoffatmung von Süßwasser- und Meeresalgen. Acta phytochim. **9**, 235—264 (1937). — Wolf, J.: Nichtflüchtige Mono-, Di- und Tricarbonsäuren. In Paech-Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. II, S. 478—538. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

Dr. H.-G. Schlegel, München 38, Botan. Inst. d. Univ. Menzingerstr. 67

Planta, Bd. 47, S. 527—531 (1956)

Kurze Mitteilung

Aus dem Biologischen Laboratorium der Österreichische Stickstoffwerke AG Linz/Donau (Leiter: Priv.-Doz. Dr. Hans Linser)

EINE EINFACHE ARBEITSWEISE FÜR DEN KOLEOPTILZYLINDERTEST

Von

Oswald Kiermayer

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 8. Juni 1956)

Zur biologischen Testung pflanzeneigener oder synthetischer Zellstreckungs-Wuchsstoffe ist bereits eine so große Zahl verschiedener Methoden entwickelt worden, daß es notwendig scheint, aus der Fülle von Testen jeweils das für einen bestimmten Zweck günstigste Verfahren auszuwählen. Während bei der Prüfung von, durch einfache Diffusion (Abfangung) gewonnenen Wuchsstoffen aus Pflanzenmaterial bzw. zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten (Molekulargewichtsbestimmung) vornehmlich der klassische Avena-Test von Went (1929), zur Testung synthetischer Stoffe der „Pastentest" von Linser (1938), der „Erbsentest" von Went bzw. verschiedene „Wurzelwachstumsteste" herangezogen werden können, scheint zur Testung der aus Papierchromatogrammen pflanzlicher Extrakte gewonnenen Eluate besonders der „Koleoptilzylindertest" geeignet. Dieser wurde im Jahre 1933 bei Untersuchungen über den Zusammenhang von Wuchsstoffwirksamkeit und Atmung von J. Bonner entwickelt und beruht im wesentlichen darauf, daß aus der Wachstumszone von Avena-Koleoptilen gleichlange Stücke herausgeschnitten und in Wuchsstofflösungen bestimmter Konzentration eingelegt werden. Der Längenunterschied der behandelten Schnitte gegenüber den Wasserkontrollen wird als Kriterium für die Wuchsstoffwirksamkeit des betreffenden Stoffes ausgewertet. Der Koleoptilzylindertest wurde seither von vielen Autoren, unter anderen von Schneider (1938), Rietsema (1949), Bentley (1950) und Hancock u. Barlow (1953) sowie von Pohl (1953) in verschiedener Weise modifiziert zu einer exakten quantitativen Bestimmungsmethode ausgearbeitet und u. a. von Bennet-Clark, Tambiah und Kefford (1952) in Verbindung zu papierchromatographischen Untersuchungen herangezogen.

Da jedoch die meisten der beschriebenen Ausführungsmethoden entweder umständlich zu handhaben und die Auswertung unter dem Meßmikroskop erfolgen muß, soll im folgenden eine, im hiesigen Laboratorium übliche empfindliche Methode beschrieben werden, die speziell für papier-

chromatographische Serien-Untersuchungen entwickelt wurde und die eine rasche Testauswertung an Hand von Kontaktkopien erlaubt. Die Herstellung von Kontaktkopien hat sich vor allem deshalb sehr bewährt, weil diese einerseits bleibende Protokolle darstellen und andererseits eine sehr rasche Längenmessung erlauben.

Material und Methodik. Zur Verwendung kommt reines Hafer-Saatgut der Sorte „Flämingsgold" oder „Flämingstreue". Die Anzucht des Versuchsmaterials erfolgt wie beim Pastentest von LINSER (1938): Durch Ausklauben oder Windsichtung werden nur Körner von möglichst einheitlichem Korngewicht genommen. Die nichtentspelzten Samen werden in flachen Schalen (18 cm-Durchmesser) in destilliertem Wasser in einem temperaturkonstanten Dunkelraum (23 $\pm$ 5° C) gequollen, wobei sie von einer Philips-Leuchte (TL 40 W 33/L), die in einem Abstand von 40 cm von den Schalen entfernt angebracht ist, zur Unterdrückung der Mesokotylbildung beleuchtet werden. Nach 48 Std. werden die Körner gut mit destilliertem Wasser abgespült und zum Keimen auf Filtrierpapier, das mit Nährlösung[1] getränkt ist, ausgelegt. Nach 24 Std. werden Keimlinge, die bereits 3 Wurzeln entwickelt haben, in Abständen von 12 mm auf vorbereitete Glasplatten (210 $\times$ 50 $\times$ 2 mm), die mit Filtrierpapier umwunden sind, so aufgestellt, daß das obere Ende der bespelzten Körner genau mit dem oberen Rand der Platte übereinstimmt. Die aufgelegten Körner werden sodann mit einem Blatt Filtrierpapier bedeckt, das mit einem Gummiring an die Glasplatte gedrückt wird. Diese beschickten Glasplatten werden in Abständen von 15 mm in Kunststoffschalen (230 $\times$ 170 $\times$ 40 mm), welche seitliche Einkerbungen haben, die ein lotrechtes Aufstellen der Platten ermöglichen, eingestellt. Je 2 solcher Schalen kommen unter einen Dunkelsturz aus Sperrholz (350 $\times$ 300 $\times$ 150 mm) und verbleiben dort bei konstanter Temperatur (23 $\pm$ 5° C), bis die Koleoptilen eine Länge von 20—25 mm erreicht haben. (Über die genaue Anzuchtmethode vgl. LINSER 1938, 1939 und LINSER u. KIERMAYER 1956b.) Kürzere oder längere Koleoptilen werden zum Test nicht verwendet.

Haben die Koleoptilen die gewünschte Länge erreicht, so werden mittels einer scharfen Rasierklinge die Keimlinge vom Korn getrennt und das Primärblatt *von unten her* aus der Koleoptile gezogen. Man geht dabei am besten so vor, daß einige Millimeter oberhalb der Schnittfläche in die Koleoptile vorsichtig ein leichter Einschnitt gemacht wird und das untere Koleoptilstück durch leichtes Drehen vom Primärblatt abgezogen wird. Aus dem verbleibenden Koleoptilschaft ragt nun das Primärblatt frei heraus und kann durch vorsichtiges Ziehen leicht aus diesem entfernt werden.

[1] Lösung A: 5,6 g $Ca(NO_3)_2$ + Spuren $FeCl_3$ in 5000 cm³ Aqua dest. Lösung B: 1,4 g KH_2PO_4; 1,4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in 5000 cm³ Aqua dest.

Die primärblattlosen Koleoptilen mit einer ungefähren Länge von 15—20 mm werden in eine Präzisionsschneidevorrichtung eingelegt, die aus einer Metallplatte mit 10, etwa 2 mm breiten Rillen zum Aufnehmen der Koleoptilen besteht. Quer zu den Rillen verlaufen 3 feine, als Führung von 3 Rasierklingen dienende Spalten, die *genauestens* 3 mm weit voneinander entfernt sind. Die Rasierklingen sind in einem kippbaren Halter angebracht. Alle Metallteile des Schneidegerätes sind mit Zaponlack gestrichen, um Verunreinigungen der Schnitte durch das Metall (Messing) zu verhindern.

In die 10 Rillen des Schneidegerätes werden nun die Koleoptilen so eingelegt, daß deren Spitzen am vorderen Rillenende anstoßen. Durch Abwärtsdrücken des Halters werden aus jeder Koleoptile 2, insgesamt also 20, genau 3 mm lange Koleoptilzylinder herausgeschnitten, die für den Test weiterverwendet werden, während die Koleoptilspitzen (3 mm) und die unteren Teile der Koleoptilen verworfen werden.

Je 20 solcher Zylinder kommen in ein Schälchen (28 mm ⌀, 20 mm Höhe), das maximal 1 cm^3 der wäßrigen Versuchslösung enthält. Die Schälchen werden sodann 5 min. im Exsiccator durch Evakuieren mit der Wasserstrahlpumpe und Wiedereinlassen von Luft infiltriert und schließlich unter Dunkelstürzen bei 23 $\pm$ 0,5° C aufgestellt.

Die *Auswertung* des Testes erfolgt so, daß die Koleoptilen nach 24stündiger Versuchsdauer in bereits vorbereitete und entsprechend beschriftete Plättchen mit einem aufgeklebten Ring aus Plexiglas eingelegt werden. Da die Koleoptilzylinder vor dem Einlegen oberflächlich vollkommen trocken sein müssen, wird am besten so vorgegangen, daß die Versuchszylinder samt der verwendeten Lösung aus den Schälchen auf Filtrierpapier ausgegossen werden und von dort nach Abtrocknung mit einer weichen Pinzette oder einem Glasstift in die Plexiringe eingelegt und darin geordnet werden.

Die Plexiringe passen genau in die Öffnung eines Diapositivkopiergerätes der Firma Leitz/Wetzlar. Aus diesem Gerät wird das zum Anpressen des Filmes vorgesehene Glas entfernt, so daß die eingelegten Plexiplättchen durch Abwärtsdrücken des Verschlusses fest auf den darunterliegenden Diapositivfilm gedrückt werden. Als Filmmaterial verwendet man vorteilhaft einen feinkörnigen orthochromatischen Film, mit dem bei Rotlicht gearbeitet werden kann. Die Belichtung des Films geschieht mit dem Licht eines hochgestellten photographischen Vergrößerungsapparates (zerstreutes Licht gibt unscharfe Kontaktbilder). Zur Längenmessung der auf den Kontaktkopien abgebildeten Koleoptilzylinder wird der entwickelte Negativfilm in ein Lesegerät eingespannt, in welchem es möglich ist, ohne Verdunklung des Raumes bei starker und vor allem konstanter Vergrößerung die Längenmessung mit Hilfe eines Millimeter-Meßstreifens durchzuführen.

Als Meß-Kriterium dient der Wert „Z%", das ist der prozentuelle Längenzuwachs der behandelten Koleoptilzylinder gegenüber dem Längenzuwachs der Kontrollen. Für jede einzelne Versuchsprobe (Konzentration; bei Papierchromatogrammen pro Chromatogrammabschnitt) werden 20 Koleoptilzylinder verwendet, aus denen der Mittelwert berechnet wird.

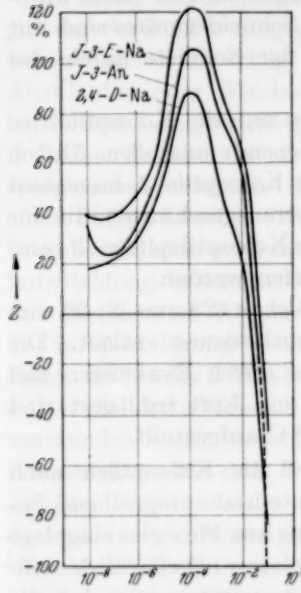

Abb. 1. Konzentrations-Wirkungskurven für Indol-3-essigsäure (Na-Salz) (I-3-E-Na), Indol-3-acetonitril (I-3-An) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Na-Salz, 2,4-D-Na). Abszisse: Wuchsstoffkonzentration in %. Ordinate: Perzentuelle Längenzunahme

Die *Konzentrations-Wirkungskurve.* In Abb. 1 sind einige Standard-Konzentrations-Wirkungskurven, wie sie mit der beschriebenen Methode erhalten wurden, für einige synthetische Wuchsstoffe wiedergegeben. Wird auf der Ordinate der prozentuelle Längenzuwachs der behandelten Zylinder (Z%) gegenüber dem Zuwachs der Kontrollen, auf der Abszisse der Logarithmus der Wuchsstoffkonzentration aufgetragen, so ergibt sich bei Verwendung von Indol-3-essigsäure (Na-Salz) eine hohe Optimumskurve, deren Maximum bei einer Konzentration von 10^{-4}% und einem Z%-Wert von 120,5% liegt, dagegen bei 10^{-1}% bis auf —46,4% in den Hemmbereich abfällt.

Einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf zeigten auch Indol-3-acetonitril (das Präparat wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. JONES, Manchester, überlassen) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Na). Es war auffallend, daß das Förderungsmaximum bei *allen* getesteten Substanzen bei einer Konzentration von 10^{-4}% lag, während z. B. im Pastentest (LINSER 1938) Indol-3-acetonitril eine 8—10mal größere Wirkung zeigte als Indol-3-essigsäure (LINSER und KIERMAYER 1956a), 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure dagegen schwächer fördernd wirkte als Indol-3-essigsäure. Indol-3-acetonitril wirkte in einer Konzentration von 10^{-1}% bereits toxisch.

Der mittlere Fehler von 10 Mittelwerten aus je 20 Koleoptilzylindern aus zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Versuchen lag zwischen $\pm$ 24,4 und $\pm$ 2,6 Z%. Die mittlere Abweichung der Zuwachswerte der 20 Koleoptilzylinder eines einzigen durchgeführten Versuches von deren Mittelwert lag zwischen $\pm$ 21,5 und $\pm$ 8%.

Zusammenfassung

Es wird eine einfache und schnell zu handhabende Arbeitsweise für den Koleoptilzylindertest zur Prüfung von Wuchsstoffen speziell in Verbindung mit papierchromatographischen Untersuchungen beschrieben. Der Test, dessen Auswertung an Hand von Kontaktkopien erfolgt, hat bei Verwendung von Indol-3-essigsaurem Natrium sein Optimum bei einer Konzentration von 10^{-4}% und lieferte sehr hohe Förderungswerte (120,5%).

Literatur

Bennet-Clark, T. A., M. S. Tambiah and N. P. Kefford: Estimation of plant growth substances by partition chromatography. Nature (Lond) **169**, 452 (1952). — Bentley, J. A.: An examination of a method of auxin assay using the growth of isolated sections of Avena coleoptiles in test solutions. J. of exper. Bot. **1**, 201 (1950). — Bonner, J.: The action of plant-growth hormone. J. gen. Physiol. **17**, 63 (1933). — Hancock, C. R., and H. W. B. Barlow: The assay of growth substances by a modified straight growth method. Ann. Rept. East Malling research Station Kent 1952, 88 (1953). — Linser, H.: Zur Methodik der Wuchsstoffbestimmung. Planta (Berl.) **28**, 227 (1938). — Zur Methodik der Wuchsstoffbestimmung. II. Die Extraktion von Pflanzenmaterial. Planta (Berl.) **29**, 392 (1939). — Linser, H., u. O. Kiermayer: Zur Wirkungsweise von Wuchs- und Hemmstoffen. V. Die Konzentrations-Wirkungskurve von Indol-3-essigsäure in Gegenwart anderer synthetischer Wuchsstoffe. Biochim. et biophysica Acta **19**, 341 (1956a). — Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe. Wien: Springer 1956b. — Pohl, R.: Zur Reaktionsweise des Wuchsstoffes bei der Zellstreckung. Z. Bot. **41**, 343 (1953). — Schneider, Ch. L.: The interdependance of auxin and sugar for growth. Amer. J. Bot. **25**, 258 (1938). — Went, F. W.: Wuchsstoff und Wachstum. Rec. Trav. bot. néerl. **25**, 1 (1929).

Dr. Oswald Kiermayer,
Biologisches Laboratorium der Österreichische Stickstoffwerke AG, Linz/Donau

Planta, Bd. 47, S. 532—546 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

ÜBER DIE PROTOCHLOROPHYLLREDUKTION IN EINER MUTANTE VON ARABIDOPSIS THALIANA (L) HEYNH

Von

GERHARD RÖBBELEN

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Mai 1956)

Die meisten Untersuchungen über das Protochlorophyll und seinen Zusammenhang mit dem Chlorophyll wurden an etiolierten Pflanzen durchgeführt. So konnte SCHARFNAGEL (1931) zeigen, daß nach einer kurzen Belichtung von nur drei Minuten sämtliches Protochlorophyll in etiolierten Maisblättern verschwunden und statt dessen Chlorophyll zu finden ist. Damit wurde zum ersten Male das von PRINGSHEIM (1875) entdeckte Etiolin (= Protochlorophyll nach MONTEVERDE 1894) nicht als Zersetzungsprodukt des Chlorophylls angesehen, wie noch LIRO (1908) und MONTEVERDE u. LUBIMENKO (1911) es deuteten, sondern als dessen Vorstufe wahrscheinlich gemacht. Den endgültigen Beweis für diesen letzten Schritt in der Biosynthesekette des Chlorophylls lieferte SMITH (1948). Ihm gelang es, durch niedere Temperaturen (0—7° C) die Neubildung von Protochlorophyll in etiolierten Gerstenkeimlingen vollständig zu hemmen und nun bei Belichtung der Pflanzen quantitativ den Übergang von Protochlorophyll in Chlorophyll zu erfassen. Überdies ließ sich bei Verwendung monochromatischen Lichtes nachweisen, daß die Umsetzung mit einem Aktionsspektrum verläuft, das mit dem Absorptionsspektrum des Protochlorophylls gut übereinstimmt (FRANK 1946; KOSKI, FRENCH u. SMITH 1951). Zugleich wurden in neueren Arbeiten Daten für eine extreme Lichtempfindlichkeit dieses Hydrierungsprozesses ermittelt: Intensitäten von einigen Lux (WALLACE u. SCHWARTING 1954) und Expositionszeiten von wenigen Minuten (KOSKI 1950) reichen aus, das Protochlorophyll in etiolierten Blättern vollständig in Chlorophyll umzusetzen. Es schien also berechtigt, die Reduktion des Protochlorophylls zu Chlorophyll als einen photochemischen Vorgang aufzufassen.

Bei einer näheren Analyse der Faktoren, die im lebenden Blatt diese Reaktion beeinflussen, ergaben sich jedoch Hinweise, daß der photochemische Prozeß wohl der wichtigste, aber nicht der einzige, wirksame Mechanismus ist (vgl. PIRSON 1953, 1955; GRANICK 1951; EGLE 1953). Mit besonderer Deutlichkeit haben das die Versuche von SMITH u. BENITEZ (1954) dargelegt: 1. Die Chlorophyllbildung bei Belichtung

etiolierter Gerstenblätter ist deutlich temperaturabhängig, was bei einem rein photochemischen Prozeß nicht der Fall ist: Bei —77° C verläuft sie mit stark verminderter Geschwindigkeit, bei —195° C ist das Protochlorophyll im Licht weitgehend stabil. — 2. Die Protochlorophyllumwandlung hat eine obere Temperaturgrenze von etwa +50° C. Sie scheint demnach an einen Pigment-Eiweißkomplex gebunden zu sein, der als „Protochlorophyll-Holochrom" bezeichnet wird. Wird diese Bindung gespalten, z. B. dadurch, daß das Protochlorophyll in organischen Lösungsmitteln gelöst oder in Blättern eingefroren und wieder aufgetaut wird, so verliert es die Fähigkeit, in Chlorophyll überzugehen. — 3. In lebenden, etiolierten Blättern setzt sich das Protochlorophyll, selbst unter günstigen Temperatur- und Lichtbedingungen, nie vollständig in Chlorophyll um, wie es ebenfalls bei einer rein photochemischen Reaktion zu erwarten wäre. Vielmehr nähert sich die Aktionskurve mit der Zeit einem Endwert, den Smith u. Benitez (1954) als ein Anzeichen für intermolekulare Prozesse bei der Wasserstoffübertragung ansehen. Aus dieser Analyse folgern die Autoren, daß höchstwahrscheinlich die Bildung des Chlorophylls aus Protochlorophyll keine streng photochemische, intramolekulare Wasserstoffumlagerung innerhalb des Holochroms sei, sondern physikalisch-chemische Vorgänge (collision processes) dabei eine Rolle spielen. Ob aber das zweite reagierende System ein anderes Protochlorophyllmolekül oder eine andere Substanz ist, die durch das vom Protochlorophyll absorbierte Licht angeregt wird, blieb bisher unbeantwortet.

Arabidopsis thaliana ist ein Objekt, das offenbar besonders leicht mutiert und dementsprechend in allen Mutationsversuchen eine sehr hohe Anzahl von Chlorophyllmutanten hervorbringt. In einem solchen Versuch trat nach Samenbestrahlung in der F_2 eine chlorophylldefekte Mutante auf, deren Kotyledonen Protochlorophyll lichtstabil erhalten konnten, auch ohne nur die geringste Menge von Chlorophyll zu bilden. Für die Frage nach dem Mechanismus der Protochlorophyllhydrierung schien es besonders bedeutungsvoll, die Ursachen dieses Verhaltens aufzuklären.

A. Experimenteller Teil

1. Material und Methode

Nach Röntgenbestrahlung angequollener Samen von *Arabidopsis thaliana*, Herkunft Antwerpen, traten in der F_2 in einer Nachkommenschaft unter 438 normalen 14 gelbe Keimlinge auf, die außer den Kotyledonen keine weiteren Blätter entwickeln konnten und nach 20 Tagen eingingen, als die Reservestoffe aus den Samen verbraucht waren. Diese rezessive Mutante ließ sich heterozygot erhalten. Sie spaltete in der Folge stets im Verhältnis 3:1 aus den Heterozygoten heraus, die phänotypisch von den homozygotisch Normalen nicht zu unterscheiden sind. Im Gewächshaus auf Saatschalen in Erde ausgesät sind die Kotyledonen der Mutanten zuerst gelblich, bleichen aber 1—2 Tage, nachdem sie sich entfaltet haben, fast völlig

aus. In starkem Schatten (etwa 1000 Lux) erhalten sie jedoch ihre Farbe bis kurz vor dem Absterben. Die gelblichen Keimlinge sind 10 Tage nach der Aussaat, wenn die grünen ihre Primärblätter anlegen, etwa um $^2/_3$ kleiner als diese, aber morphologisch und anatomisch weitgehend gleich gestaltet. Auch die Plastiden zeigen unter dem Mikroskop hinsichtlich ihrer Größe, Anzahl und Struktur nur unwesentliche Abweichungen (RÖBBELEN, unveröff.).

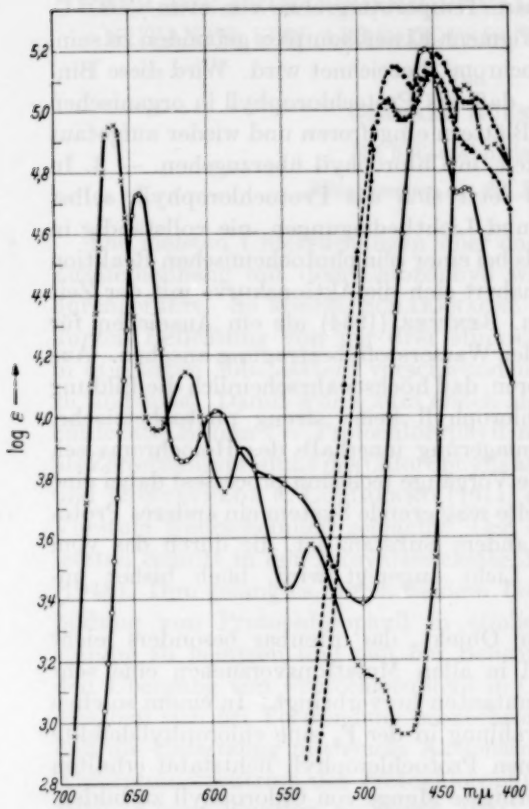

Abb. 1. Molare Extinktionskoeffizienten der vier Plastidenpigmente in Äther. Chlorophyll a ×—×, Chlorophyll b ○—○, Carotine ▲---▲ und Xanthophylle ●---●

Für die Untersuchungen wurden die Samen von heterozygoten Pflanzen im Zimmer bei etwa 1000 Lux auf feuchtes Filtrierpapier ausgesät. Wie später zu zeigen sein wird, wäre es aus theoretischen Gründen von Interesse gewesen, auch im Dunkeln Mutanten heranzuziehen. Jedoch war das bisher leider nicht möglich, weil keine Merkmale zu finden waren, an denen sie in Dunkelkultur von den etiolierten, normalen Keimlingen zu unterscheiden sind. — Im übrigen wurden für die Versuche normale, etiolierte Keimlinge gebraucht. In völligem Dunkel keimen die Samen von *Arabidopsis thaliana* jedoch nur zu 12,3%. Zwar kann man sie nach der Aussaat noch 10 Std im Tageslicht stehen lassen, so daß sie anschließend auch im Dunkeln zu 91%, d. h. ebensogut wie die dauernd belichteten Samen, keimen. Für unsere Versuche wurden jedoch nur solche Pflanzen verwendet, die ausschließlich im Dunkeln gekeimt und herangewachsen waren. — Die Keimlinge wurden am 12. Tage nach der Aussaat untersucht. Die grüne Normalform besitzt zu diesem Zeitpunkt bereits zwei kleine Primärblättchen. Die gelben Mutanten haben den größten Teil ihrer Reservestoffe verbraucht und ihre Kotyledonen die endgültige Größe von rund 1,5 mm² oder 0,15 mg erreicht.

Für die Pigmentbestimmungen wurden jeweils 1 g Frischgewicht (das sind also etwa 2000 normale, bzw. 7000 gelbe Keimlinge!) auf einer Analysenwaage (Sartorius Selecta) gewogen und zweimal mit Aceton (p.a. Merck) und geringem $CaCO_3$-Zusatz im Homogenisator extrahiert. Sodann wurde der Überstand dekantiert, der Rückstand zweimal mit frisch destilliertem, peroxydfreiem Äther nachgewaschen, die Farblösungen vereinigt, sämtliche Pigmente im Scheidetrichter durch Wasserzusatz in den Äther überführt und dieser gründlich mit Wasser gewaschen. Die ätherische Lösung wurde im Eisschrank getrocknet und im Vakuum

eingeengt. Die ganze Aufbereitung wurde höchstens im schwachen Tageslicht ausgeführt, Arbeiten mit Protochlorophyll geschahen bis zu seiner vollständigen Extraktion in absolutem Dunkel. — Für die Konzentrationsbestimmungen wurden von diesen Extrakten mit dem Spektralphotometer (M4Q) von Zeiss im gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums von 5 Å zu 5 Å, in der Nähe der Maxima in geringeren Abständen, die Extinktionswerte gemessen[1]. Sämtliche Absorptionsspektren wurden gezeichnet, um alle Anomalien in Pigmentgehalt und -zusammensetzung zu erfassen. Dabei wurde, um konzentrationsbedingte Formänderungen der Kurven auszuschalten, die Extinktion ($E = \log I_0/I$ bei einer Schichtdicke von 1 cm) logarithmisch gegen die Wellenlänge aufgetragen, also die „typische Farbkurve" dargestellt.

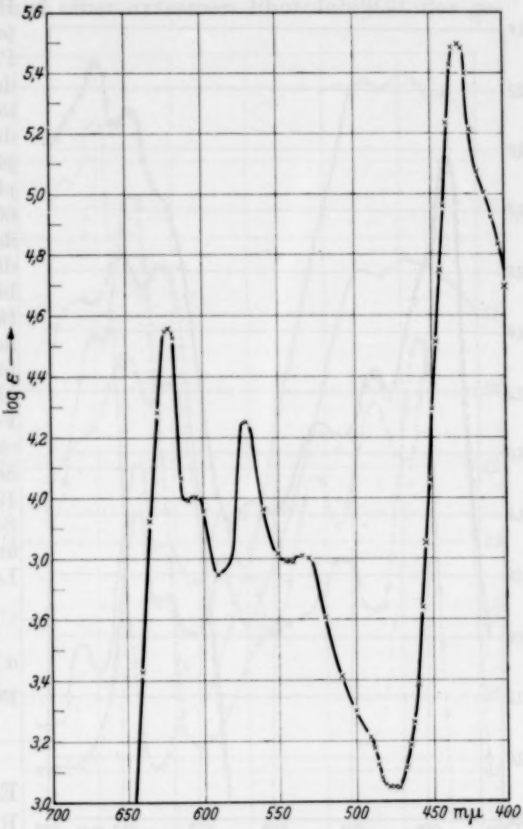

Abb. 2. Molare Extinktionskoeffizienten von Protochlorophyll in Äther

Zur genauen Festlegung unserer Meßwerte wurden für die wichtigsten Gruppen von Plastidenpigmenten die molaren Extinktionswerte (ε) neu bestimmt. Aus acetonischen Rohchlorophyllösungen von normalen bzw. etiolierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden die Farbstoffe nach der üblichen Methode von Willstätter u. Stoll (1918) durch Verteilung zwischen nicht mischbaren Lösungsmitteln isoliert — die Carotinoide nach Verseifen des Chlorophylls mit methylalkoholischer Kalilauge (vgl. Paech u. Simonis 1952) —, papierchromatographisch gereinigt (Filtrierpapier Schleicher u. Schüll Nr. 2230; Entwicklergemisch I nach L. Bauer 1952), in ätherischer Lösung spektrophotometriert, ein bestimmtes Volumen im Vakuum und Stickstoffatmosphäre getrocknet und gewogen. Anschließend wurde die Substanz wieder mit der gleichen Menge Äther aufgenommen und erneut ihre Konzentration im Spektrophotometer bestimmt. Das Chlorophyll a hatte sich, wie zu erwarten, durch das Trocknen zu mehr als 40% in Phäophytin umgewandelt, bei den anderen Pigmenten glichen die Extinktionen vor und nach der Wägung einander ausreichend gut. Die Meßwerte sind in Abb. 1 u. 2 zusammengestellt und stimmen mit den neueren Daten in der

[1] Herr Professor Dr. A. Lüttringhaus, Chemisches Institut der Universität Freiburg, stellte für diese Untersuchungen freundlicherweise das Gerät zur Verfügung; Herr Dr. R. Worthmann half mir in diesem Teil der Arbeit mit zahlreichen wichtigen Ratschlägen; ihnen sei herzlich gedankt.

Literatur gut überein (vgl. ZSCHEILE u. COMAR 1941; KOSKI u. SMITH 1948; SMITH u. BENITEZ 1955; GOODWIN 1955).

Mit Hilfe der molaren Extinktionswerte der Absorptionsmaxima (Tabelle 1) wurden nach den bekannten Ableitungen des LAMBERT-BEERschen Gesetzes (vgl. HEIERLE 1935, KOSKI 1950) die jeweiligen Konzentrationen der Pigmente aus der log I_0/I-Kurve der ätherischen Rohchlorophyll-lösung errechnet. Dazu wurden für die Bestimmung von Protochlorophyll, Chlorophyll a bzw. Chlorophyll b die Meßwerte bei 623 mμ, 660 mμ bzw. 643 mμ verwendet, da in diesem Wellenlängenbereich die Carotinoide noch nicht absorbieren. Die Carotinoidkonzentration ergab sich dann aus der restlichen Absorption des Rohchlorophylls bei 450 mμ. — Die Ergebnisse wurden vor allem bei völligem Fehlen einzelner Pigmente papierchromatographisch mit verschiedenen Entwicklergemischen (BAUER 1952, HAGER 1955; Filtrierpapier Schleicher u. Schüll Nr. 2043b; aufsteigend) und unter der UV-Lampe nachgeprüft.

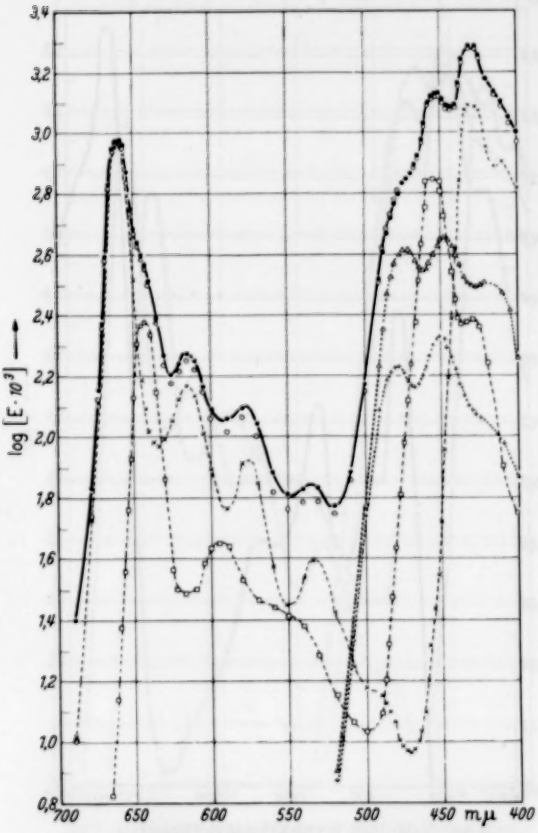

Abb. 3. *Arabidopsis thaliana*, Normalform (0,1 g Frischgewicht in 10 cm³ Äther). Absorptionsspektren von Rohchlorophyll ●—●, Chlorophyll a ×---×, Chlorophyll b □---□, Carotinen +---+ und Xanthophyllen △····△. Die Addition der Einzelpigmentextinktionen ○ ○ ergibt fast genau die Werte der Rohchlorophyllextinktion; um diese Superposition zu veranschaulichen, wurden für die Rohchlorophyllkurve die 4fachen Meßwerte aufgetragen

2. Versuche und Ergebnisse

a) Bestimmung der Plastidenpigmente von 12 Tage alten Keimlingen

In Abb. 3 u. 4 sind die Extinktionswerte ätherischer Rohchlorophyllösungen von normalen, im Licht und im Dunkeln herangezogenen Keimlingen und von solchen der Mutante aus Schattenkulturen als „typische Farbkurven" dargestellt. Die Tabelle 2 zeigt in gleicher Weise die wesentlichen Unterschiede.

1. Die etiolierten Pflanzen können eine zwar geringe, aber eindeutig meßbare Menge von Chlorophyll a bilden. In der Mutante hingegen wurde niemals, auch unter optimalen Wachstumsbedingungen und in anderen Entwicklungsstadien der Keimlinge, Chlorophyll a gefunden. Außerdem konnte auch bei wiederholten Versuchen auf Papierchromato-

grammen unter der UV-Lampe keinerlei Rotfluorescenz von Chlorophyll beobachtet werden. Das völlige Fehlen von Chlorophyll unterscheidet diese Mutante also wesentlich von solchen Albinoformen, bei denen der Chlorophyllmangel lediglich auf einer extremen Photolabilität des gebildeten Pigments beruht (vgl. Koski u. Smith 1951; Wallace u. Schwarting 1954).

2. Im roten Bereich entspricht die Absorptionskurve der Mutante fast genau der einer reinen Protochlorophyllösung. Auch im Chromatogramm war das einzige grünliche Pigment an seiner Wanderungsgeschwindigkeit (R_F-Wert) und vor allem im Vergleich mit dem Protochlorophyll etiolierter Keimlinge eindeutig als Protochlorophyll zu identifizieren. Die Mutante ist also in der Lage, Protochlorophyll aufzubauen und sogar 45% mehr zu bilden als normale, etiolierte Pflanzen (Tabelle 2). Darüber hinaus ist dieses Protochlorophyll auch im Licht weitgehend stabil und bleibt ohne jegliche photochemische Umsetzung in Chlorophyll a erhalten! Das heißt aber, daß *durch die Mutation ein genabhängiger Prozeß bei der Umwandlung von Protochlorophyll in Chlorophyll blockiert* ist. — Der Protochlorophyllgehalt normaler, grüner Keimlinge wurde zwar chromatographisch nachgewiesen, konnte aber wegen der großen Menge der chemisch und physikalisch sehr ähnlichen Chlorophylle bisher nicht exakt bestimmt werden. — Chlorophyll b wurde weder in etiolierten Pflanzen noch in der Mutante in meßbaren Mengen festgestellt.

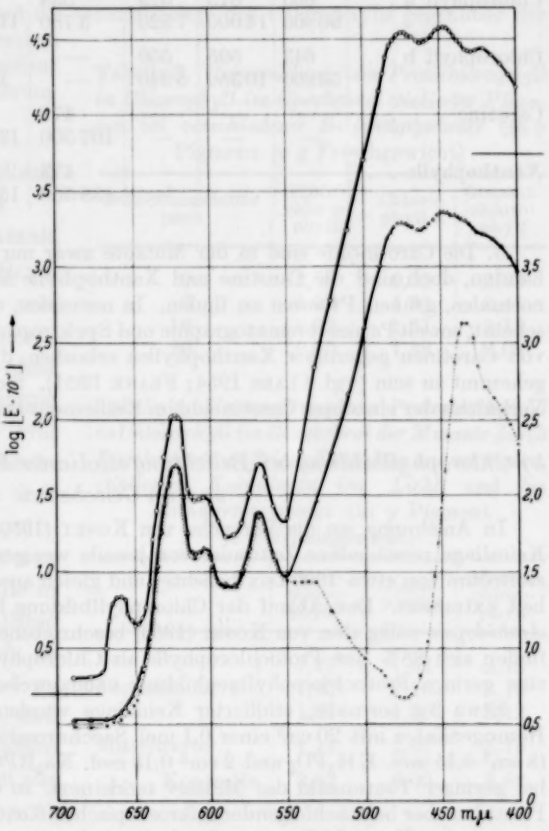

Abb. 4. *Arabidopsis thaliana*, etiolierte Normalform und Mutante (1 g Frischgewicht in 1 cm³ Äther). Absorptionsspektren der etiolierten Normalform o—o = Extinktionswerte links; der Mutante △—△ und einer reinen Protochlorophyllösung entsprechender Konzentration ×····× = Extinktionswerte rechts

Tabelle 1. *Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten der Plastidenpigmente von Arabidopsis in Äther*

Protochlorophyll	623	572	534	—	432	—	mμ
(aus etiol. Pfl.)	36400	17700	6460	—	314000	—	(mol × cm)$^{-1}$
Chlorophyll a . .	660	615	578	534	430	410	mμ
	90800	14000	7920	3780	119000	7640	(mol × cm)$^{-1}$
Chlorophyll b . .	643	595	550	—	455	430	mμ
	53800	10350	5940	—	15850	55100	(mol × cm)$^{-1}$
Carotine	—	—	—	478	451	—	mμ
	—	—	—	107500	135200	—	(mol × cm)$^{-1}$
Xanthophylle . .	—	—	—	473	447	422	mμ
	—	—	—	138500	150600	107700	(mol × cm)$^{-1}$

3. Die Carotinoide sind in der Mutante zwar nur zu etwa $^1/_3$ der Menge vorhanden, doch sind die Carotine und Xanthophylle im gleichen Verhältnis wie in normalen, grünen Pflanzen zu finden. In normalen, etiolierten Pflanzen hingegen scheint, soweit Papierchromatographie und Spektrophotometrie eine Identifizierung von Carotinen gegenüber Xanthophyllen erlauben, die Carotinbildung fast völlig gehemmt zu sein (vgl. CLAES 1954; FRANK 1951). Sicher ist, daß das gegenseitige Verhältnis der einzelnen Carotinoide im Etiolement stark verschoben ist.

b) Chlorophyllbildung bei Belichtung etiolierter Pflanzen in heilen Blättern und im Gewebebrei

In Anlehnung an die Versuche von KOSKI (1950) wurden normale, etiolierte Keimlinge verschiedene Zeitdauer von jeweils wenigen Minuten mit einer Leuchtstoffröhre von etwa 1000 Lux belichtet und gleich anschließend in völliger Dunkelheit extrahiert. Der Ablauf der Chlorophyllbildung bei Belichtung entsprach bei *Arabidopsis* völlig den von KOSKI (1950) beschriebenen Ergebnissen: Nach 10 min finden sich 88% des Protochlorophylls als Chlorophyll a wieder, nach 20 min ist eine geringe Protochlorophyllneubildung nachzuweisen.

Etwa 2 g normaler, etiolierter Keimlinge wurden nun im Dunkeln in einem Homogenisator mit 20 cm^3 einer 0,1 mol. Saccharoselösung, der ein Phosphatpuffer (8 cm^3 0,15 mol. KH_2PO_4 und 2 cm^3 0,15 mol. Na_2HPO_4; $p_H = 6{,}2$) zugesetzt war, bei geringer Tourenzahl des Messers zerkleinert, so daß die Zellen geöffnet, die Plastiden aber bei nachfolgender mikroskopischer Kontrolle noch zu gut 60% unverletzt waren. Um Schädigungen durch den freigesetzten Vakuolensaft vorzubeugen, wurde der Gewebebrei schnellstens vorsichtig filtriert und der Rückstand sogleich wieder mit 2 cm^3 frischer Saccharoselösung aufgenommen. Dieser Ansatz wurde nun in gleicher Weise wie vorher die heilen Keimlinge belichtet. Anschließend

Tabelle 2. *Pigmentgehalt 12 Tage alter Keimlinge* (in γ Pigment je g Frischgewicht[1])

	Proto-chlorophyll	Chloro-phyll a	Chloro-phyll b	Carotine	Xantho-phylle
Normale, grüne Keimlinge .	—	933,0	401,0	125,3	246,9
Normale, etiolierte Keimlinge	2,68	0,05	—	0,43	141,37
Mutante (Schattenkultur) .	3,82	0,00	—	38,52	71,65

[1] Die Werte der Tabellen 2—5 wurden zwecks besserer Übersichtlichkeit aus den Meßwerten in diese Einheiten umgerechnet.

wurde die Flüssigkeit mit einer Nutsche, deren Undurchlässigkeit für Plastiden und andere Zellstrukturen von mehr als 1 μ Durchmesser durch ein zusätzlich eingelegtes Filtrierpapier (Schleicher u. Schüll Nr. 1575) garantiert war, abgesaugt und der Rückstand in der üblichen Weise, stets im Dunkeln, extrahiert. Die Werte in Tabelle 3 zeigen, daß auch auf diese Weise noch eine gute Chlorophyllbildung möglich ist. Nach 10 min Belichtung haben sich 76% des Protochlorophylls in Chlorophyll a umgesetzt. Daß die Gesamtmenge des Chlorophylls gegenüber der Kontrolle um rund 20% gesunken ist, ist durch den Fermentfreilauf als Folge der Gewebezerstörung durchaus zu erklären.

Tabelle 3. *Umwandlung von Protochlorophyll in Chlorophyll im Gewebebrei etiolierter Pflanzen bei verschiedener Belichtungsdauer* (in γ Pigment je g Frischgewicht)

Belichtungsdauer (sec)	Protochlorophyll	Chlorophyll a	Gesamtchlorophyll
0	2,68	0,05	2,73
5	1,09	1,32	2,41
10	0,62	1,51	2,13
20	0,70	1,38	2,08

c) Versuche zur Umwandlung des Protochlorophylls in Chlorophyll a in der Mutante

Nachdem Godnev u. Slyk (1955) den Übergang von Protochlorophyll in Chlorophyll in Maisblättern ohne Einwirkung von Lichtenergie allein durch Zugabe von Wundsaft aus Tannen beobachtet hatten, zeichnete sich die Möglichkeit ab, protochlorophyllhaltigen Blättern Substanzen zuzugeben, die in ihnen die Chlorophyllsynthese fördern können. Da sich in den bisher beschriebenen Vorversuchen erwiesen hatte, daß die Protochlorophyllreduktion auch in einem Gewebebrei aus etiolierten Keimlingen noch recht ungestört abläuft, schien es aussichtsreich, in einem solchen dem Protochlorophyll-Holochrom die für seine Reduktion notwendigen Agentien zuzuführen.

Tabelle 4. *Umwandlung von Protochlorophyll in Chlorophyll im Gewebebrei der Mutante durch Zugabe eines wäßrigen Extraktes aus normalen, etiolierten Keimlingen im Licht und bei Zimmertemperatur* (in γ Pigment je g Frischgewicht)

	Protochlorophyll	Chlorophyll a	Gesamtchlorophyll
Versuchs-Nr. 1	1,21	1,92	3,13
	1,03	2,16	3,19
	1,17	1,95	3,12
Mittelwerte . .	1,14	2,01	3,15
Kontrolle	3,82	0,00	3,82

Etwa 5 g normaler, etiolierter Keimlinge wurden im Dunkeln mit 5 cm³ Leitungswasser homogenisiert und 12 Std in einem Eisschrank bei +3° C dunkel gestellt. Anschließend wurde, wie bereits beschrieben, mit Filtrierpapier abgenutscht und eine Probe des Extraktes im Spektrophotometer gemessen (Abb. 6, Kurve ○—○). Sie war zwar kolloidal, aber völlig farblos, zeigte im sichtbaren Wellenlängenbereich keine Absorption und enthielt keine meßbaren Mengen von Plastidenpigmenten. Dieses Ergebnis entsprach den Untersuchungen von Smith u. Ahrne (1955), nach denen das Protochlorophyll-Holochrom auch in Suspensionen aus etiolierten Gerstenblättern an strukturierte Partikelchen mit einem Durchmesser von 2—5 μ gebunden ist. — Zugleich wurde aus 1 g von im Schatten kultivierten Keimlingen der Mutante, wie oben für etiolierte Pflanzen beschrieben, ein Gewebebrei hergestellt.

1. Versuch. Zu Beginn wurde ein solcher aus Mutanten hergestellter Gewebebrei als Blindversuch in der üblichen Weise extrahiert und sein Pigmentgehalt bestimmt. Sodann wurde zu drei weiteren Ansätzen jeweils die gleiche Menge des Extraktes aus etiolierten Keimlingen zugesetzt, 10 min belichtet und dann aufgearbeitet. Tabelle 4 und Abb. 5 zeigen eindeutig, daß nach Zugabe des Extraktes und Belichtung Chlorophyll a gebildet wurde und dementsprechend die Protochlorophyllmenge abgenommen hat. *Aus normalen, etiolierten Pflanzen läßt sich also ein wäßriger Extrakt herstellen, der in der Mutante die Protochlorophyllhydrierung ermöglicht*, die zuvor genetisch blockiert war.

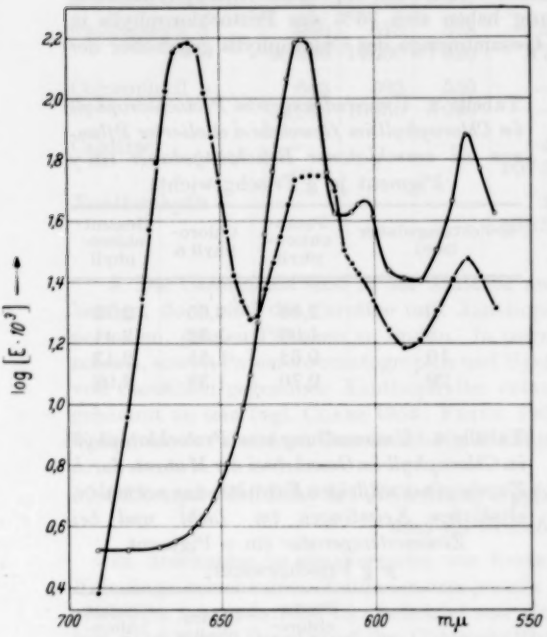

Abb. 5. *Arabidopsis thaliana*, Mutante (1 g Frischgewicht in 1 cm³ Äther). Umwandlung von Protochlorophyll in Chlorophyll a durch Zugabe eines Extraktes aus normalen, etiolierten Keimlingen. Absorptionsspektren des „Rohchlorophylls" vor der Extraktzugabe o—o und nach der Extraktzugabe ●—●

Aus grünen Blättern konnte mit den angewendeten Methoden kein wirksamer Extrakt gewonnen werden. Mit Hilfe des Absorptionsspektrums ließ sich das nicht erklären (Abb. 6, Kurve ×—×), was allerdings wenig besagt; denn die Kurven sind nur rohe Summenkurven einer größeren Anzahl von Stoffen und ihre Deutung ist auch wegen der kolloidalen Natur der Lösungen nicht einfach. Möglicherweise wird das reagierende System bei der laufenden Chlorophyllbildung in grünen Blättern schnell verbraucht. Inwieweit der einzige Unterschied in der Absorption der Extrakte aus im Licht und im Dunkeln gewachsenen Pflanzen bei 340 mμ in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist, wird noch zu erörtern sein.

Tabelle 5. *Umwandlung von Protochlorophyll in Chlorophyll im Gewebebrei der Mutante unter verschiedenen Bedingungen* (in γ Pigment je g Frischgewicht)

Versuchs-Nr.	Von Versuch 1 abweichende Bedingungen	Protochlorophyll	Chlorophyll a	Gesamtchlorophyll
2	Abkochen des Extraktes	3,49	0,00	3,49
3	Dunkelheit	3,61	0,09	3,70
4	—30° C	1,56	0,86	2,42
5	Oxydation des DPNH .	2,78	0,00	2,78
	Reduktion des DPN⁺ .	1,22	0,76	1,98
	Kontrolle	3,82	0,00	3,82

2. Versuch. Es wurde der Extrakt aus etiolierten Blättern im Wasserbad auf 100° C erhitzt, so daß sämtliche Eiweißstoffe, Fermente u. dgl. ausflockten. Mit einer derart vorbehandelten Lösung ließ sich anschließend im Gewebebrei der Mutante keine Chlorophyllbildung mehr induzieren (Tabelle 5). Es ist daher wahrscheinlich, daß *mit dem Extrakt eine eiweißartige Substanz zugesetzt* wurde, deren wirksame Komponente durch Erhitzen denaturierbar ist.

3. Versuch. Weiterhin wurde versucht, entsprechend den Angaben von Godnev u. Slyk (1955), auch ohne Belichtung bloß durch Zugabe des Extraktes Chlorophyllbildung im Gewebebrei der Mutante zu erreichen. Tatsächlich ließ sich bei völliger Dunkelheit während des ganzen Versuches (d. h. bis einschließlich zur Extraktion des Gewebebreies) nach 30 min eine geringe Menge Chlorophyll extrahieren (s. Tabelle 5). Die Chlorophyllbildung erreichte dabei im Verhältnis zum vorhandenen Protochlorophyll etwa die Größenordnung, wie sie im normalen, etiolierten Keimling (vgl. Tabelle 2) vorliegt. Offensichtlich *ermöglicht die Zugabe des Extraktes in der Mutante wieder den normalen Ablauf der Licht- und Dunkelreaktionen bei der Chlorophyllsynthese.*

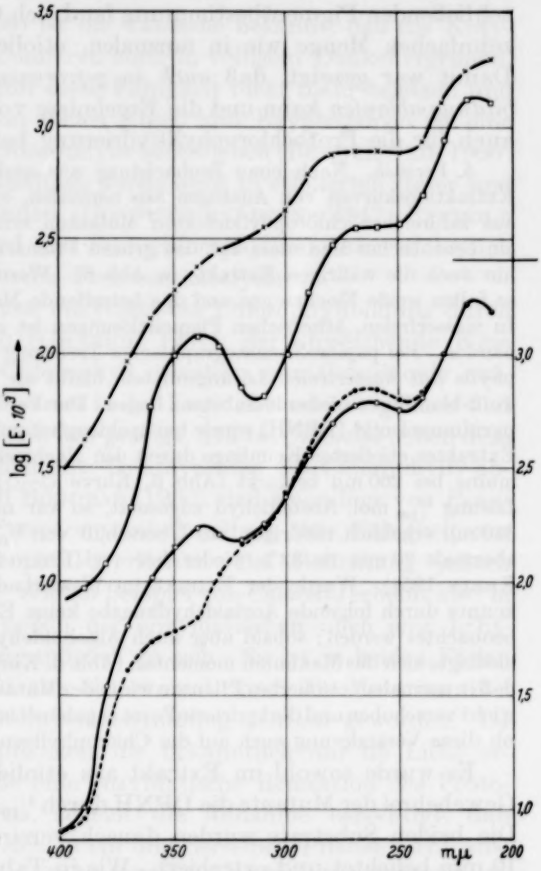

Abb. 6. Absorptionsspektren wäßriger Extrakte aus der Normalform ×—× und der Mutante □—□ = Extinktionswerte links; aus der etiolierten Normalform ○—○ und derselbe nach Zugabe von Acetaldehyd und Alkoholdehydrogenase ●---● = Extinktionswerte rechts

4. Versuch. Die erhebliche Temperaturunempfindlichkeit, die Smith u. Benitez (1954) für die Photoreduktion des Protochlorophylls konstatierten, wurde auch am eigenen Material mit der vorliegenden Methode geprüft. Dazu wurde der Extrakt zum Gewebebrei hinzugefügt und 20 min im Dunkeln stehen gelassen, so daß entsprechend dem 3. Versuch

sich größenordnungsmäßig eine Chlorophyllmenge wie die in etiolierten, normalen Keimlingen gebildet haben mußte. Nun wurde der Gewebebrei in einer Kältemischung aus Viehsalz, Wasser und Aceton (30:50:50) auf etwa —30° C eingefroren und dann 20 min belichtet. Bei der anschließenden Pigmentbestimmung fand sich Chlorophyll a in nahezu der zehnfachen Menge wie in normalen, etiolierten Pflanzen (Tabelle 5). Damit war gezeigt, daß *auch in gefrorenem Zustand die Chlorophyllbildung ablaufen* kann und die Ergebnisse von SMITH u. BENITEZ (1954) auch für die Protochlorophyllhydrierung bei *Arabidopsis* gelten.

5. Versuch. Nach einer Beobachtung aus anderen Versuchsserien weisen die Extinktionskurven von Auszügen aus normalen, etiolierten Keimlingen wie auch aus zahlreichen chlorophylldefekten Mutanten mit 85%igem Aceton bei 340 mμ ein beachtliches Maximum auf, das grünen Pflanzen weitgehend fehlt (vgl. daraufhin auch die wäßrigen Extrakte in Abb. 6). Werden diese Lösungen entwässert, so fallen weiße Flocken aus und das betreffende Maximum ist erheblich niedriger. In wasserfreien, ätherischen Pigmentlösungen ist es in gleicher Weise kaum vorhanden. Bei papierchromatographischer Trennung nicht entwässerten Rohchlorophylls mit wasserfreien Lösungsmitteln bleibt an der Auftragslinie eine intensiv weiß-blau fluorescierende Substanz liegen. Der Verdacht auf hydriertes Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) wurde bei spektrophotometrischer Messung des wäßrigen Extraktes etiolierter Keimlinge durch den Nachweis eines zweiten größeren Maximums bei 260 mμ bestärkt (Abb. 6, Kurve ○—○). — Wurde nun einer solchen Lösung $^1/_{100}$ mol. Acetaldehyd zugesetzt, so war nach 20 min das Maximum bei 340 mμ erheblich niedriger, ein Überschuß von $^3/_{10}$ mol. Aethanol stellte es nach abermals 20 min zu 82% wieder her (vgl. CHANCE 1954, RAFTER, CHAYKIN u. KREBS 1954). Wurde der Extrakt im Wasserbad 5 min auf 100° C erhitzt, so konnte durch folgende Acetaldehydzugabe keine Extinktionsabnahme bei 340 mμ beobachtet werden; sobald aber auch Alkoholdehydrogenase zugefügt wurde, erniedrigte sich das Maximum momentan (Abb. 6, Kurve ●---●). Damit war erwiesen, daß in normalen, etiolierten Pflanzen wie in der Mutante das DPN^+-DPNH-Gleichgewicht verschoben und die hydrierte Form angehäuft ist. Es ergab sich daraus die Frage, ob diese Veränderung auch auf die Chlorophyllsynthese irgendeinen Einfluß hat.

Es wurde sowohl im Extrakt aus etiolierten Pflanzen als auch im Gewebebrei der Mutante die DPNH durch $^1/_{10}$ mol. Acetaldehyd oxydiert. Die beiden Substrate wurden danach vereinigt, in der üblichen Weise 10 min belichtet und extrahiert. Wie in Tabelle 5 zu ersehen ist, bleibt unter diesen Bedingungen die Umsetzung von Protochlorophyll in Chlorophyll aus. Wird dem Extrakt nach der Acetaldehydzugabe ein Überschuß von $^3/_{10}$ mol Äthanol zugesetzt, so ist deutlich eine Chlorophyllbildung nachzuweisen (Tabelle 5). Es ist also denkbar, daß ein DPN-spezifisches Ferment in die Protochlorophyllhydrierung eingeschaltet und nach dessen Oxydation die Wasserstoffübertragung gehemmt ist. — Der reziproke Nachweis, daß DPNH im Verlauf der Protochlorophyllreduktion oxydiert wird, hatte ein negatives Ergebnis; die DPNH-Menge verringerte sich nicht in eindeutiger Weise. Jedoch nimmt auch in heilen, etiolierten Blättern die DPNH bei Belichtung erst nach mindestens 24 Std meßbar ab, wenn die Keimlinge bereits einen grünen Schimmer haben, also schon kräftig assimilieren.

Damit sind die Versuche abgeschlossen, soweit sie mit dieser zwar kleinen, aber doch recht interessanten *Arabidopsis*-Mutante erreichbar waren.

B. Theoretischer Teil

Seit Julius Sachs (1859) ist die Tatsache bekannt, daß die Kotyledonen der Sämlinge von Coniferen auch in völligem Dunkel ergrünen, während die folgenden Blätter diese Fähigkeit nicht mehr besitzen und folglich etiolieren. Auch von vielen Algen und Kryptogamen ist eine solche Dunkelsynthese des Chlorophylls beschrieben (Burgerstein 1900; Myers 1940 u. a.), und neuerdings wurde auch in etiolierten Hafer und Weizen Chlorophyll a gefunden (Goodwin u. Owens 1947; Seybold 1948). In allen Fällen wird die Protochlorophyllreduktion sicherlich weitgehend durch enzymatische Prozesse katalysiert.

Bei *Chlorella* ließ sich diese enzymatische Chlorophyllbildung durch eine „Mutation" blockieren (Granick 1951); der abweichende Klon konnte im Dunkeln kein Chlorophyll, sondern nur Carotinoide entwickeln. Im Licht hingegen war er in der Lage, normal zu ergrünen und zu assimilieren. Auf diese Weise war gezeigt, daß bei *Chlorella* neben dem bekannten Dunkelprozeß auch eine Lichtsynthese des Chlorophylls ablaufen kann. Weiterhin fand Bogorad (1950), daß Keimlinge von *Pinus Jeffreyi* im Anschluß an Streptomycinbehandlung ihre Fähigkeit zur Dunkelsynthese von Chlorophyll verlieren. Bei Belichtung jedoch können sie normal ergrünen. Wie im Beispiel von *Chlorella* scheint also in den Coniferenkotyledonen neben der enzymatischen auch eine lichtabhängige Chlorophyllbildung möglich zu sein. Sie ist in beiden Fällen normalerweise verdeckt und nur hier einmal durch die Mutation, das andere Mal durch die Streptomycinbehandlung sichtbar geworden. Da schließlich auch in Blütenpflanzen, die bekanntlich nur im Licht ergrünen, in begrenztem Maße eine enzymatische Reduktion des Protochlorophylls gefunden wurde, scheint die Annahme berechtigt, daß Licht- und Dunkelreaktion sich in ein und derselben Pflanze nicht ausschließen, sondern nur verschiedene Möglichkeiten der Chlorophyllbildung darstellen, die sich unter normalen Umständen jeweils in verschiedener Weise überlagern oder ergänzen.

Bei *Arabidopsis* sind ebenfalls beide Prozesse nachzuweisen. Neben der photochemischen Reaktion läßt sich im Etiolement auch eine gewisse enzymatische Protochlorophyllreduktion erkennen. Offensichtlich verläuft die Chlorophyllbildung auf diesem Wege aber erheblich langsamer als im Licht, so daß die Synthese bald mit dem Dunkelabbau des Chlorophylls (Frank u. Kenney 1955) ein Gleichgewicht eingeht und stets nur geringe Mengen von Chlorophyll im etiolierten Blatt vorhanden sind.

In unserer Mutante ist die Protochlorophyllhydrierung genetisch blockiert. Das bedeutet einmal, daß die Dunkelsynthese, also die Enzymreaktion, gehemmt ist. — Im direkten Versuch konnte zwar nur

ermittelt werden, daß im Licht in der Mutante keinerlei Chlorophyll, also auch nicht auf enzymatischem Wege, gebildet wird. Eine Dunkelkultur der Mutante war aus den oben angeführten Gründen nicht möglich. Doch besteht wenig Anlaß anzunehmen, daß, wenn ihr im schwachen Licht eine enzymatische Protochlorophyllreduktion unmöglich ist, sie diese im Dunkeln durchführen kann. Es ist also wohl berechtigt, aus dem Verhalten im Licht kultivierter Keimlinge zu folgern, daß in ihnen der enzymatische Prozeß unter allen Umständen blockiert ist. — Wird der Mutante aber im Dunkeln ein Extrakt aus normalen, etiolierten Keimlingen zugeführt, so läuft die Reaktion normal ab, und es wird ebensoviel Chlorophyll gebildet wie in normalen, etiolierten Keimlingen. Dieser Versuch hat in der Enzymforschung zahlreiche Parallelen und läßt sich häufig damit erklären, daß durch die Mutation ein genabhängiges Ferment ausgefallen ist, das experimentell in die Reaktionskette wieder eingefügt werden kann.

Darüber hinaus ist aber durch die gleiche Mutation auch die Lichtreaktion unterbrochen, was nicht ohne weiteres zu verstehen ist. Wie einleitend erwähnt, hatten bereits die Untersuchungen von SMITH u. BENITEZ (1954) ergeben, daß trotz des entscheidenden Lichteinflusses die Umsetzung nicht als streng photochemisch bezeichnet werden dürfe, sondern mindestens noch ein zweites Molekül auf die Reduktion des Protochlorophylls einen Einfluß hat. Die Extraktversuche an der *Arabidopsis*-Mutante können nun zeigen, daß dieser Komplex sicher nicht bloß ein zweites nicht aktiviertes Protochlorophyll-Holochrom, sondern eine andere bisher unbekannte, eiweißartige Substanz ist. — Zum anderen war in den Temperaturversuchen von SMITH u. BENITEZ (1954) aber auch klar geworden, daß der letzte, lichtabhängige Schritt vom Protochlorophyll zum Chlorophyll bei Blütenpflanzen offenbar nicht enzymatischer Natur ist. Zwar gibt es Fermente, z. B. Lipasen und Invertasen, die auch bei erheblich niederen Temperaturen noch wirksam sind. Doch haben diese sämtlich einen weitaus höheren Temperaturkoeffizienten; bei Temperaturerhöhung von —15° auf +20° C wird die Reaktionsgeschwindigkeit um das 200- bzw. 600fache erhöht, hingegen bei der Protochlorophylltransformierung nur um das 10fache bei einem Temperaturanstieg von —77° auf +20° C. Vor allem sind alle diese Fermente bei —77° C praktisch wirkungslos. Die Protochlorophyllreduktion aber war auch bei —77° C erst um $^2/_3$ des Wertes bei Zimmertemperatur abgesunken (SMITH u. BENITEZ 1954). Daß der zugesetzte Extrakt in der *Arabidopsis*-Mutante bei solch niederen Temperaturen auch noch eine vergleichbare Wirksamkeit hat, konnte zwar nicht experimentell festgestellt werden, erscheint aber nach dem vorliegenden Kälteversuch durchaus möglich. — Auch die Versuche von VIRGIN (1955) sprechen gegen eine Einwirkung regulärer Enzyme bei der Photoreduktion des Protochlorophylls: In intermittierendem Licht ist gegenüber kontinuierlichem die Ausbeute an Chlorophyll nicht erhöht. Der

Hydrierungsprozeß wird demnach im Dunkeln sehr schnell abgestoppt, als „Fermente" könnten höchstens solche Substanzen bei der Umsetzung mitwirken, die durch Lichtenergie kurzfristig aktiviert werden können.

Die Frage nach der Natur des durch die Mutation ausgefallenen Systems und seinem Wirkungsmechanismus muß also zunächst offen bleiben. Es läßt sich lediglich feststellen, daß durch die Mutation eine eiweißartige Substanz ausgefallen bzw. verändert ist, die neben einer Wirksamkeit in der enzymatischen Protochlorophyllreduktion auch in den photochemischen Prozeß eingeschaltet ist. Damit hängen zumindest an dieser Stelle beide Reaktionswege der Protochlorophyllhydrierung zusammen. Demnach scheint es für die Kenntnis der photochemischen Reduktion bedeutungsvoll zu sein, bei allen Untersuchungen gleichzeitig auf die enzymatischen Prozesse zu achten. So ist wohl auch ein Versuch von Smith u. Ahrne (1955) aufzufassen, die in Extrakten von Protochlorophyll-Holochrom aus Bohnenblättern die Chlorophyllbildung bei Belichtung durch Zugabe eines gleichen Extraktes aus Gerstenblättern hemmen konnten. Hier liegt möglicherweise eine ähnliche Hemmung der Lichtreaktion durch die enzymatischen Prozesse bei der Chlorophyllbildung vor wie in den eigenen Versuchen, bei denen in den Extrakten die DPN Hoxydiert wurde.

Zusammenfassung

1. In den Keimlingen einer rezessiven, monohybrid spaltenden Mutante von *Arabidopsis thaliana* ist die photochemische wie die enzymatische Chlorophyllbildung aus Protochlorophyll blockiert.

2. Es kann aus normalen, etiolierten Pflanzen ein wäßriger Extrakt hergestellt werden, der in der Mutante den normalen Ablauf des Hydrierungsprozesses induziert.

3. Die Möglichkeit wird diskutiert, daß die photochemische und die enzymatische Protochlorophyllreduktion zumindest in ihrem letzten Reaktionsglied zusammenhängen.

Meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. Friedrich Oehlkers, möchte ich an dieser Stelle für seine stete Hilfsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen und Ratschläge im Verlauf dieser Arbeit danken. Alle notwendigen Geräte und Mittel für diese Untersuchungen hat in großzügiger Weise die Deutsche Forschungsgemeinschaft bereitgestellt, der hiermit ebenfalls gedankt sei.

Literatur

Bauer, L.: Trennung der Carotinoide und Chlorophylle mit Hilfe der Papierchromatographie. Naturwiss. **39**, 88 (1952). — Bogorad, L.: Effects of streptomycin on chlorophyllformation in dark-grown seedlings. Amer. J. Bot. **37**, 676 (1950). — Burgerstein, A.: Über das Verhalten der Gymnospermenkeimlinge im Lichte und im Dunkeln. Ber. dtsch. bot. Ges. **18**, 168—184 (1900). — Chance, B.: Spectrophotometry of intracellular respiratory pigments. Science (Lancaster, Pa.) **120**, 767—775 (1954). — Claes, H.: Analyse der biochemischen Synthesekette für Carotinoide mit Hilfe von Chlorella-Mutanten. Z. Naturforsch. **9b**, 461—469 (1954). — Egle, K.: Die Biosynthese der Chlorophyllfarbstoffe. Naturwiss. **40**, 569—576 (1953). — Frank, S.: The effectiveness of the spectrum in chlorophyllformation. J. gen. Physiol. **29**, 157—179 (1946). — The relation between carotenoid

and chlorophyll pigments in Avena coleoptiles. Arch. of Biochem. **30**, 52—61 (1951). — FRANK, S., and A. L. KENNEY: Chlorophyll and carotenoid destruction in the absence of light in seedlings of Zea mays L. Plant Physiol. **30**, 413—418 (1955). — GODNEV, T. N., u. A. A. SLYK: Neues von der Biosynthese des Pflanzenchlorophylls (russ.). Priroda (Leningrad) **1955**, H. 5, 48—51. — GOODWIN, R. H., and O. v. H. OWENS: The transformation of chlorophyll a in etiolated oat seedlings. Plant Physiol. **22**, 197 (1947). — GOODWIN, T. W.: Carotenoids. In Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, herausgeg. von K. PAECH u. M. V. TRACEY, Bd. 3, S. 272—311. 1955. — GRANICK, S.: Biosynthesis of chlorophyll and related pigments. Ann. Rev. Plant Physiol. **2**, 115—144 (1951). — HAGER, A.: Chloroplastenfarbstoffe, ihre papierchromatographische Trennung und ihre Veränderungen durch Außenfaktoren. Z. Naturforsch. **10b**, 310—312 (1955). — HEIERLE, E.: Blattfarbstoffuntersuchungen an einer grün- und gelbblättrigen Tabak-Varietät. Ber. schweiz. bot. Ges. **44**, 17—86 (1935). — KOSKI, V. M.: Chlorophyllformation in seedlings of Zea mays L. Arch. of Biochem. **29**, 339—343 (1950). — KOSKI, V. M., C. S. FRENCH and J. H. C. SMITH: The action spectrum for the transformation of protochlorophyll to chlorophyll a in normal and albino corn seedlings. Arch. of Biochem. a. Biophysics **31**, 1—17 (1951). — KOSKI, V. M., and J. H. C. SMITH: The isolation and spectral absorption properties of protochlorophyll from etiolated barley seedlings. J. Amer. chem. Soc. **70**, 3558—3562 (1948). — Chlorophyll formation in a mutant, white seedling-3. Arch. of Biochem. a. Biophysics **34**, 189—195 (1951). — LIRO, J. I.: Über die photochemische Chlorophyllbildung bei den Phanerogamen. Ann. Acad. Sci. Fenn., Ser. A **1**, 1—147 (1908). — MYERS, J.: A study of pigments produced in darkness by certain green algae. Plant Physiol. **15**, 575—588 (1940). — MONTEVERDE, N.: Scripta bot. Horti Univ. Imp. Petropolitanae **13**, 210 (1894). Zit. nach J. I. LIRO 1908. — MONTEVERDE, N., u. W. LUBIMENKO: Untersuchungen über die Chlorophyllbildung bei den Pflanzen. Biol. Zbl. **31**, 481—498 (1911). — PAECH, K., u. W. SIMONIS: Übungen zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Berlin 1952. — PIRSON, A.: Stoffwechsel organischer Verbindungen. I (Photosynthese). Fortschr. Bot. **14**, 289—333 (1953); **17**, 529—578 (1955). — PRINGSHEIM, H.: Über natürliche Chlorophyllmodifikationen und die Farbstoffe der Florideen. Mber. d. kgl. Akad. d. Wiss. zu Berlin, Dec. S. 745—759. 1875. — RAFTER, G. W., E. G. CHAYKIN and E. G. KREBS: The action of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on reduced diphosphopyridine nucleotide. J. of biol. Chem. **208**, 805—811 (1954). — RÖBBELEN, G.: Mutationsversuche an *Arabidopis thaliana* (L.) HEYNH. Unveröff. — SCHARFNAGEL, W.: Biologische Untersuchungen zur Chlorophyllbildung. Planta (Berl.) **13**, 716—744 (1931). — SEYBOLD, A.: Zur Kenntnis des Protochlorophylls. III. Planta (Berl.) **36**, 371 bis 388 (1948). — SMITH, J. H. C.: Protochlorophyll, precursor of chlorophyll. Arch. of Biochem. **19**, 449—454 (1948). — SMITH, J. H. C., and I. M. AHRNE: The holochromes of etiolated tissues. Carnegie Inst. Wash. Year Book **54**, 157—159 (1955). — SMITH, J. H. C., and A. BENITEZ: The effect of temperature on the conversion of protochlorophyll to chlorophyll a in etiolated barley leaves. Plant Physiol. **29**, 135—143 (1954). — Chlorophylls: Analysis in plant materials. In Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, herausgeg. von K. PAECH u. M. V. TRACEY, Bd. 4, S. 142—196. 1955. — VIRGIN, H. I.: The conversion of protochlorophyll to chlorophyll a in continuous and intermittent light. Physiol. Plantarum **8**, 389—403 (1955). — WALLACE, R. H., and A. E. SCHWARTING: A study of chlorophyll in a white mutant strain of Helianthus annuus. Plant Physiol. **29**, 431—436 (1954). — WILLSTÄTTER, R., u. A. STOLL: Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918. — ZSCHEILE, F. P., and C. L. COMAR: Influence of preparative procedure on the purity of chlorophyll components as shown by absorption spectra. Bot. Gaz. **102**, 463—481 (1941).

Dipl. agr. GERHARD RÖBBELEN, Freiburg i. Br.,
Botanisches Institut der Universität, Schänzlestr. 9/11

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach Jansen" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Fortschritte der chemischen Forschung

Herausgegeben von **F. G. Fischer,** Würzburg, **H. W. Kohlschütter,** Darmstadt, **Kl. Schäfer,** Heidelberg. Schriftleitung: **H. Mayer-Kaupp,** Heidelberg.

III. Band, 3. Heft. Mit 53 Textabbildungen. 246 Seiten Gr.-8°. 1955. DM 36.—

Inhaltsübersicht: **Chemical Treatment of Isotopes Produced in a Nuclear Reactor.** By G. B. Cook and H. Seligman. — **Kleine Kohlenstoffringe.** Von E. Vogel. — **Die Sensibilisierung der photographischen Schicht durch Farbstoffe. Ihr Wesen im Licht der neueren Forschung.** Von H. Wolff. — **Forschungsrichtungen in der Chemie des Germaniums.** Von E. Gastinger.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Physiologische Chemie

Ein Lehr- und Handbuch für Ärzte, Biologen und Chemiker. Hervorgegangen aus dem Lehrbuch der physiologischen Chemie von **Olof Hammarsten.** In zwei Bänden.

Zweiter Band: **Der Stoffwechsel**

Herausgegeben von Professor Dr. **B. Flaschenträger,** Alexandria, und Professor Dr. **E. Lehnartz,** Münster i. Westf.

Soeben erschien:

Zweiter Teil:

Bandteil a: Mit 70 Textabbildungen. IX, 1396 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 186.—

Inhaltsübersicht: **D. Physiologische Chemie einzelner Lebensvorgänge und Organe (Fortsetzung).** IV. Biochemie einiger Organe. 1. Leber und Galle. Von Z. Stary, Istanbul. a) Allgemeines. b) Die Leber im Stoffwechsel anorganischer Stoffe. c) Die Leber im Kohlenhydratstoffwechsel. d) Die Leber im Fettstoffwechsel. e) Die Leber im Stoffwechsel der Aminosäuren und der Proteine. f) Die Nucleinsäuren der Leber und ihre Bausteine. g) Die Leber im Vitaminstoffwechsel. h) Die Leber und das endokrine System. i) Die Entgiftungsfunktion der Leber. k) Die hepatotropen Cancerogene und ihre Wirkung auf den Leberstoffwechsel. l) Die Leber im Stoffwechsel der Porphyrinsubstanzen und die Ausscheidung der Gallenfarbstoffe. m) Die Galle. — 2. Muskel. Von K. Lohmann, Berlin, und P. Ohlmeyer, Tübingen. a) Skeletmuskel. b) Herzmuskel. c) Glatte Muskeln. — 3. Gehirn und Nerven. Von C. G. Schmidt, Bad Nauheim. a) Der chemische Aufbau des Zentralnervensystems und der peripheren Nerven. b) Stoffwechsel und Fermente. c) Stoffwechsel und Funktion des Zentralnervensystems. d) Chemische Vorgänge bei Erregung und Erregungsleitung. e) Schlußbemerkung. — 4. Auge und Tränen. Von H. Süllmann, Münster i. W. a) Allgemeines. b) Die Tränenflüssigkeit. c) Die Bindehaut (Conjunctiva). d) Die Lederhaut (Sklera). e) Die Hornhaut (Cornea). f) Die Linse (Lens crystallina). g) Das Kammerwasser (Humor aquaeus). h) Der Glaskörper (Corpus vitreum). i) Die Gefäßhaut (Uvea). k) Die Netzhaut (Retina). l) Der Sehnerv (N. opticus). — Namen- und Sachverzeichnis.

Die Bandteile 2b und 2c, die im Laufe der nächsten beiden Jahre erscheinen, werden enthalten:

Bandteil b:

V. Die Ausscheidungen und ihre Organe. 1. Niere und Harn. Von E. Werle, München. — 2. Die Faeces. Von F. W. Krzywanek †, Berlin, und B. Flaschenträger, Alexandria. — 3. Die Haut und ihre Ausscheidungen. Von F. Schaaf, Basel. — 4. Milchdrüse und Milch. Von W. Lintzel, Krefeld. — VI. Chemische Regulationen im Stoffwechsel. 1. Die physiologische Chemie der inneren Sekretion. Von K. Junkmann, Berlin. — 2. Vitamine. Von H. Rudy, Mannheim, bearbeitet von H.-J. Bielig, Heidelberg (Allgemeines und Vitamin A), K. Schreier, Heidelberg (Vitamin B) und H. Wolf, Heidelberg (übrige Vitamine). — 3. Phytohormone. Von J. Reinert, Tübingen. — VII. Abwehrreaktionen. 1. Entgiftung. Von A. W. Forst, München. — 2. Immunchemie. Von O. Westphal, Säckingen. — Namen- und Sachverzeichnis.

Bandteil c:

VIII. Fortpflanzung und Wachstum. Von H. Druckrey, Freiburg i. Br. Biochemie der Gene. Von W. Weidel, Tübingen. — IX. Biochemie der Tumoren. Von H. Dannenberg, Tübingen. — X. Das Ei. Von M. Tomita, Kobe (Japan). — **E. Gesamtstoffwechsel und Ernährung.** Von H. Kraut, Dortmund. — **F. Vergleichende Physiologische Chemie.** I. Viren. Von G. Schramm, Tübingen. II. Bakterien und Pilze. Von W. Franke, Köln a. Rh. III. Pflanzen. Von K. Mothes, Gatersleben. IV. Tiere. Von R. Beutler, München. — Namen- und Sachverzeichnis. — Zeittafel zur Geschichte der physiologischen Chemie und verwandter Gebiete. Von B. Flaschenträger, Alexandria. Abkürzungsverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegt ein Prospekt des Springer-Verlages, Berlin - Göttingen - Heidelberg, bei

Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany